

WO03062427

Publication Title:

METHOD OF SCREENING DRUG FOR IMPROVING INSULIN RESISTANCE

Abstract:

Abstract of WO03062427

It is intended to disclose a method of screening a protein which ligand-dependently interacts with PPAR and is highly useful as a tool for screening a drug improving insulin resistance. Using this method, a main effect ligand-dependent PPAR-binding molecule ECHLP, a main effect ligand-selective PPARgamma acting factor FLJ13111 and a side effect ligand-dependent PPAR-binding molecule AOP2 are obtained. It is also intended to disclose a screening system for a drug improving insulin resistance selectively exerting the main effect without causing any side effect which is constructed by using PPAR-interacting 10a7 ECHLP, PPAR-interacting FLJ13111 and PPAR-interacting AOP2. It is furthermore intended to disclose a process for producing medicinal compositions for improving insulin resistance containing, as the active ingredient, a PPAR main effect promoter, a PPAR main effect-specific agonist, a PPAR-interacting ECHLP inhibitor promoting the main effect of PPAR, a substance regulating the side effect of PPARgamma, a PPAR-interacting AOP2 inhibitor regulating the side effect of PPARgamma, a PPAR-interacting FLJ13111 activator promoting the main effect of PPAR or an FLJ13111 expression accelerator which can be obtained by the above screening method. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年7月31日 (31.07.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/062427 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/12, 15/62, 15/81, C07K
14/705, 16/18, C12N 1/19, 1/21, A61P 3/10, C12Q 1/66

丘 2 1 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 井鍋 一則
(INABE, Kazunori) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県 つくば
市 御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/00546

(22) 国際出願日: 2003年1月22日 (22.01.2003)

(74) 代理人: 長井 省三, 外(NAGAI, Shozo et al.); 〒174-
8612 東京都板橋区 蓮根三丁目 1 7 番 1 号 山之内製
薬株式会社 特許部内 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.

(30) 優先権データ:

特願2002-13721 2002年1月23日 (23.01.2002) JP
特願2002-257703 2002年9月3日 (03.09.2002) JP

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI
特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 山之内
製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL
CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8411 東京都中央区日本橋
本町二丁目 3 番 1 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 遠藤 英樹 (EN-
DOH, Hideki) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県 つくば市 御
幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 中野
亮介 (NAKANO, Ryosuke) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県
つくば市 御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内 Ibaraki
(JP). 黒崎 英志 (KUROSAKI, Eiji) [JP/JP]; 〒305-8585
茨城県 つくば市 御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会
社内 Ibaraki (JP). 加藤 美雪 (KATO, Miyuki) [JP/JP]; 〒
305-8585 茨城県 つくば市 御幸が丘 2 1 山之内製
薬株式会社内 Ibaraki (JP). 横田 博之 (YOKOTA, Hi-
royuki) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県 つくば市 御幸が

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF SCREENING DRUG FOR IMPROVING INSULIN RESISTANCE

(54) 発明の名称: インスリン抵抗性改善薬のスクリーニング法

WO 03/062427 A1

(57) Abstract: It is intended to disclose a method of screening a protein which ligand-dependently interacts with PPAR and is highly useful as a tool for screening a drug improving insulin resistance. Using this method, a main effect ligand-dependent PPAR-binding molecule ECHLP, a main effect ligand-selective PPAR γ acting factor FLJ13111 and a side effect ligand-dependent PPAR-binding molecule AOP2 are obtained. It is also intended to disclose a screening system for a drug improving insulin resistance selectively exerting the main effect without causing any side effect which is constructed by using PPAR-interacting ECHLP, PPAR-interacting FLJ13111 and PPAR-interacting AOP2. It is furthermore intended to disclose a process for producing medicinal compositions for improving insulin resistance containing, as the active ingredient, a PPAR main effect promoter, a PPAR main effect-specific agonist, a PPAR-interacting ECHLP inhibitor promoting the main effect of PPAR, a substance regulating the side effect of PPAR γ , a PPAR-interacting AOP2 inhibitor regulating the side effect of PPAR γ , a PPAR-interacting FLJ13111 activator promoting the main effect of PPAR or an FLJ13111 expression accelerator which can be obtained by the above screening method.

[続葉有]



(57) 要約:

インスリン抵抗性改善薬をスクリーニングするのに有用なツールとなるリガンド依存的にPPARと相互作用する蛋白質をスクリーニングする方法を開示する。前記方法により、主作用リガンド依存性PPAR結合分子ECHLP、主作用リガンド選択的PPAR γ 作用因子FLJ13111及び副作用リガンド依存性PPAR結合分子AOP2を得た。PPAR相互作用ECHLP、PPAR相互作用FLJ13111及びPPAR相互作用AOP2を用いることにより、主作用を選択的にもたらしめて副作用を引き起こさないインスリン抵抗性改善薬のスクリーニング系を構築しこれを開示する。また、前記スクリーニング方法により得ることができる、PPARの主作用促進剤、PPARの主作用特異的アゴニスト、PPARの主作用を促進するPPAR相互作用ECHLP阻害剤、PPAR γ の副作用を抑制する物質、PPAR γ の副作用を抑制するPPAR相互作用AOP2阻害剤、PPARの主作用を促進するPPAR相互作用FLJ13111活性化剤、又はFLJ13111発現亢進剤を有効成分とするインスリン抵抗性改善用医薬組成物の製造方法を開示する。

明 細 書

インスリン抵抗性改善薬のスクリーニング法

技術分野

本発明は、リガンド依存的にPPARと相互作用する蛋白質をスクリーニングする方法、該蛋白質を利用したインスリン抵抗性改善薬のスクリーニング方法に関する。

背景技術

インスリン抵抗性改善薬として効果が認められているチアゾリジン誘導体はペルオキシソーム増殖剤応答性受容体ガンマ(peroxisome proliferator activated receptor : PPAR γ)のアゴニストとして作用することが示されている(非特許文献1参照)。チアゾリジン誘導体のPPAR γ との親和性は生体内の血糖降下作用と相関することから、該化合物群のインスリン抵抗性改善作用はPPAR γ を介した作用であると考えられている(非特許文献2参照)。このためPPAR γ のアゴニストの検出方法はインスリン抵抗性糖尿病治療薬をスクリーニングする有効な手法であると考えられてきた。

糖尿病は、膵臓から分泌されるインスリンの作用不足から引き起こされるが主に2つのタイプが存在する。1型糖尿病と呼ばれるものは膵臓の β 細胞が破壊されて発病し、治療にはインスリンを必要とする。一方で2型糖尿病(インスリン非依存型糖尿病)は遺伝的な要素に過食や運動不足、ストレスなど、身体に負担となる生活習慣が加わり発病する。日本人の糖尿病では1型はごくわずかで2型が大部分を占めており、2型糖尿病患者ではインスリンによる糖代謝促進が起こりにくいインスリン抵抗性が生じている。そのため糖尿病の治療薬には単純な血糖降下剤のみでなく、インスリン抵抗性改善により糖代謝を促進する2型糖尿病の治療を対象とした研究が進められてきた。

PPARは核内受容体スーパーファミリーに属し、リガンドの結合によって活性化される転写促進因子として標的遺伝子上流にある応答配列に結合し、その転写を

誘導することが知られている(非特許文献3参照)。

PPARには3つのサブタイプの存在が知られており、PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ と称する(非特許文献4-5参照)。更に、種々の化合物について、PPARのサブタイプの活性化やその血糖、あるいは脂質低下作用についての報告がなされている。例えば、糖尿病治療薬であるチアゾリジン誘導体はPPAR γ のリガンドであり、血清中のトリグリセリドレベルを有意に低下させることが知られている(非特許文献6-9参照)。一方、古くから脂質低下薬として用いられているフィブレート系薬剤は、PPAR α のリガンド効果を有することが知られており、臨床では、強い血清トリアシルグリセロールレベルの低下が認められている(非特許文献10-11参照)。

PPAR γ アゴニストは細胞の増殖を停止し、細胞分化を促進することが報告されている(非特許文献12参照)。PPAR γ は特に脂肪組織で発現が認められ(非特許文献13-14参照)、ホモ欠損型マウスでは脂肪細胞の分化誘導が起こらない。またPPAR γ のアゴニストとして作用するチアゾリジン誘導体の投与は大型脂肪細胞の減少と小型脂肪細胞の増加を引き起こす(非特許文献15参照)。以上の知見から、チアゾリジン誘導体がインスリン抵抗性を改善する機構はPPAR γ アゴニストが急速に脂肪細胞の分化を促進する結果、インスリン抵抗性誘発原因物質であるTNF α の産生抑制、末梢組織でのグルコーストランスポーター発現の促進、遊離脂肪酸産生の抑制が起こり、結果、細胞内への糖取り込みが亢進して高血糖が改善されると考えられている。(非特許文献16参照)。

近年チアゾリジン誘導体を用いた臨床での知見から、PPAR γ のアゴニスト作用を持つ従来の合成リガンドは、インスリン抵抗性改善作用のみでなく、いずれも生体内の循環血漿量を増大させて浮腫を惹起することが報告された(非特許文献17-18参照)。このPPAR γ の合成アゴニストによる浮腫の惹起は心肥大等をもたらす重篤な副作用であり、インスリン抵抗性改善という主作用との乖離が強く望まれている。しかしながら、これまでPPAR γ とリガンドの複合体がどのようなシグナル経路を介して前述の脂肪細胞の分化及びインスリン抵抗性改善と、浮腫の惹起という異なる応答を誘導するのか、そこに至る分子メカニズムは解明されていない。

PPARの転写因子活性には他の核内受容体同様に転写共役因子群との相互作用が

必要であり、PPARと相互作用する因子を同定しようとする試みがなされて来た。実際に、生化学的な手法により、既存の核内受容体相互作用因子とPPAR γ との結合が調べられており、SRC-1(非特許文献19参照)、CBP/p300(非特許文献20参照)、DRIP205、TRAP220(非特許文献21参照)、SMRT(非特許文献22参照)、Gadd45(非特許文献23参照)、RIP140(非特許文献24参照)など複数の分子がPPAR γ と相互作用することが報告されている。同じく生化学的な手法で、レチノイドXレセプター(RXR: retinoid X receptor)がPPARとリガンドの存在依存的にヘテロダイマーを形成し、標的遺伝子上流の応答配列に結合することが報告されている(非特許文献25参照)。しかしながら、これらの共役因子群のアゴニスト依存性や、下流のシグナル経路にどのように関わるか、その詳細な機構は明らかでない。

一方、新規の核内受容体の相互作用因子を網羅的に探索する方法として、リガンドを介在させた、酵母ツーハイブリッドシステム(Yeast Two-hybrid system)(非特許文献26参照)を用いる手法が広く用いられてきたが、ことPPAR γ に関してはこれまで酵母ツーハイブリッドシステムでリガンド依存的な結合因子を見つけることが困難であった。リガンドを介在させない酵母ツーハイブリッドシステムでPPAR γ 結合因子を探索した結果では、PBP(非特許文献27参照)、PGC-1(非特許文献28参照)、PGC-2(非特許文献29参照)、SHP(非特許文献30参照)などのPPAR γ 結合因子が報告されているが、いずれの因子もリガンドの非存在下においてもPPAR γ と相互作用しており、明らかなリガンド依存的PPAR γ 結合因子は得られてこなかった。また酵母ツーハイブリッドシステムでPPAR γ と相互作用因子の結合におけるリガンド依存性を検出したとするわずかな報告例は、いずれも既存の核内受容体の相互作用因子をPPAR γ とともに発現させた酵母を培養、濃縮して相互作用を検出したもので(特許文献1及び非特許文献24参照)、cDNAライブラリーから明らかなリガンド依存性を有するPPAR γ の相互作用因子を、酵母ツーハイブリッドシステムでスクリーニングすることに成功した事例はなかった。例えば、上述のGadd45及びPGC-1は、サブタイプのPPAR α を含めて核内受容体とのリガンド依存的な相互作用が酵母ツーハイブリッドシステムで検出されているにもかかわらず、PPAR γ に関しては生化学的手法でしかリガンド依存性が見られない(非特許文献24参照)。生化学的手法と酵母を用いる手法では感度、プローブ対

相互作用因子の比率が異なるため、PPAR γ リガンドの作用を酵母ツーハイブリッドシステムでは効率よく検出できないと説明されてきた(非特許文献24参照)。しかし生化学的な手法は1対の蛋白質間の相互作用を検出するのには適しているが、特定の蛋白質に相互作用する蛋白質を網羅的に検索することが困難である。一方酵母ツーハイブリッドシステムでは特定の蛋白質と相互作用する蛋白質をライブラリー中から検索することが可能である。

以上述べたように、浮腫の惹起という副作用とインスリン抵抗性改善という主作用との乖離が強く望まれていながら、そこに至る分子メカニズムは解明されておらず、メカニズムの解明と副作用の少ないインスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法が待望されていた。

一方、ECHLP/Ech1は分子内に脂肪酸代謝に働くエノイルCoA加水酵素(enoyl-CoA hydratase)とジエノイルCoA異性化酵素(dienoyl-CoA isomerase)の2種類の酵素活性領域と予想される構造を有しており(非特許文献31参照)、配列に関して種々の報告があるが(特許文献2-7参照)、その生理機能は明らかではなかった。AOP2は分子内にペルオキシダーゼ様配列を持つことから抗オキシダント蛋白質2(anti-oxidant protein 2: Genbank アクセッション番号XM_001415)と呼称されており配列に関して種々の報告がある(特許文献8-12参照)。実際の生理活性としてはカルシウム非依存性のフォスホリパーゼA2として機能する報告があり(非特許文献32参照)、またマウスでは同Aop2蛋白質の遺伝子座が多嚢胞性腎症の原因遺伝子として報告されている(非特許文献33参照)。このようにAOP2はそのアミノ酸配列構造から予想される分子機能とは異なる作用を持つことが明らかであり、その本来の生理機能は確定されていない。FLJ13111の配列に関する報告はあるが(特許文献13-14参照)、FLJ13111は機能未知の蛋白質であり、アミノ酸配列から分子内に細胞核内の存在を示唆する核標的配列やグリコシル化を受けうる部位の存在が予想される他はアミノ酸配列構造から分子機能を示唆する情報はなかった。

(特許文献1) 特開平11-56369号公報

(特許文献2) 国際公開第00/55350号パンフレット

- (特許文献3) 国際公開第02/29103号パンフレット
- (特許文献4) 国際公開第02/00677号パンフレット
- (特許文献5) 国際公開第01/49716号パンフレット
- (特許文献6) 国際公開第00/37643号パンフレット
- (特許文献7) 国際公開第01/75067号パンフレット
- (特許文献8) 国際公開第98/43666号パンフレット
- (特許文献9) 国際公開第02/12328号パンフレット
- (特許文献10) 国際公開第02/29086号パンフレット
- (特許文献11) 国際公開第02/06317号パンフレット
- (特許文献12) 国際公開第01/55301号パンフレット
- (特許文献13) 欧州特許出願公開第1074617号明細書
- (特許文献14) 国際公開第00/58473
- (非特許文献1) J. Biol. Chem. , 1995年, 第270巻, p. 12953-12956
- (非特許文献2) J. Med. Chem. , 1996年, 第39巻, p. 665-668
- (非特許文献3) Cell, 1995年, 第83巻, p. 835-839
- (非特許文献4) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994年, 第91巻, p. 7355-7359
- (非特許文献5) 蛋白質・核酸・酵素, 1995年, 第40巻, 第13号, p. 50-55
- (非特許文献6) Diabetes, 1997年, 第46巻, p. 433-439
- (非特許文献7) Diabetes Care, 1996年, 第19巻, 第2号, p. 151-156
- (非特許文献8) Diabetes Care, 1992年, 第15巻, 第2号, p. 193-203
- (非特許文献9) Diabetologia, 1996年, 第39巻, p. 701-709
- (非特許文献10) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997年, 第94巻, p. 4312-4317
- (非特許文献11) Drugs, 1990年, 第40巻, 第2号, p. 260-290
- (非特許文献12) Jpn. J. Cancer Res. , 1999年, 第90巻, p. 75
- (非特許文献13) Genes and Dev. , 1994年, 第8巻, p. 1224-1234
- (非特許文献14) Cell, 1994年, 第79巻, p. 1147-1156
- (非特許文献15) Mol. Cell, 1999年, 第4巻, p. 597-609
- (非特許文献16) J. Biol. Chem. , 1995年, 第270巻, p. 12953-12956
- (非特許文献17) Diabetes Frontier, 1999年, 第10巻, p. 811-818

(非特許文献18) Diabetes Frontier, 1999年, 第10巻, p. 819-824

(非特許文献19) Gene Expr., 1996年, 第6巻, p. 185-195

(非特許文献20) J. Biol. Chem., 1999年, 第274巻, p. 7681-7688

(非特許文献21) Mol. Cell. Biol., 2000年, 第20巻, p. 8008-8017

(非特許文献22) Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 1998年, 第95巻, p. 2920-2925

(非特許文献23) Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000年, 第272巻, 第1号, p. 193-198

(非特許文献24) Mol. Endocrinol., 1998年, 第12巻, 第6号, p. 864-881

(非特許文献25) Ann. Rev. Cell Dev. Biol., 1996年, 第12巻, p. 335-363

(非特許文献26) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991年, 第88巻, p. 9578-9582

(非特許文献27) J. Biol. Chem., 1999年, 第274巻, p. 7681-7688

(非特許文献28) Cell, 1998年, 第92巻, p. 829-839

(非特許文献29) EMBO J., 1999年, 第18巻, 第13号, p. 3676-3687

(非特許文献30) Biochim. Biophys. Acta., 1997年, 第1巻, 第1350号, p. 27-32

(非特許文献31) J. Biol. Chem., 1998年, 273巻1号: p. 349-355

(非特許文献32) J. Biol. Chem., 1997年, 272巻16号p. 10981

(非特許文献33) Genomics, 1997年, 42巻3号 p. 474-478

発明の開示

本発明者らは、酵母ツーハイブリッドシステムに、活性の高いPPAR γ アゴニストを高濃度で介在させる独自の手法により、糖代謝改善作用(主作用)惹起効果の高いアゴニストの存在に依存してPPAR γ に結合する蛋白質群、および浮腫(副作用)惹起効果の高いアゴニストの存在に依存してPPAR γ に結合する蛋白質群を同定した。その結果、主作用アゴニストに依存してPPAR γ に結合する分子として、ECH-1(enoyl-CoA hydratase)様蛋白質(enoyl-CoA hydratase like protein: ECHLP)を、副作用アゴニストに依存してPPAR γ に結合する分子として、ヒト抗オキシダント蛋白質2(anti-oxidant protein 2 またはnon-selenium glutathione peroxidase, acidic calcium-independent phospholipase A2; Genbank アクセッション番号XM_001415、以下AOP2と略記する)を見出した。

細胞中でECHLPが過剰に発現するとリガンド依存的なPPAR γ の転写誘導活性を顕著に抑制することを見出した。さらに同蛋白質は糖尿病モデルマウスにおいて血糖値の変動に関わらず発現量が亢進していることを遺伝子チップ法で測定し、同蛋白質が糖尿病態の原因因子であることを確認した。また、細胞中でAOP2が過剰に発現するとリガンド依存的なPPAR γ の転写誘導活性を顕著に促進することを見出した。さらにAOP2は糖尿病モデルマウスにおいてその蛋白質量が増大していることを2次元電気泳動法で検定し、糖尿病態における同蛋白質の過剰な存在が、PPAR γ を介して浮腫をもたらす特定の遺伝子群の発現を亢進させることを確認した。

同様に上記の酵母ツーハイブリッドシステムに活性の高いPPAR γ アゴニストを高濃度で介在させる独自の手法により、主作用アゴニストに依存してPPAR γ に結合する分子として、FLJ13111 (GenBankアクセッション番号AK023173)を見出した。さらに細胞中でFLJ13111蛋白質が過剰に発現すると主作用アゴニストに依存してPPAR γ の転写誘導活性が顕著に亢進することを見出した。さらに、FLJ13111遺伝子は、糖尿病モデルマウスの筋肉において発現が顕著に減少していることを確認した。FLJ13111のプロモーター領域を新規に取得し、FLJ13111のプロモーターアッセイを構築した。該アッセイは、PPAR γ 蛋白質を利用せずにPPAR γ リガンドあるいはインスリン抵抗性改善薬をスクリーニングするために利用できる。

これらの知見をもとにして、PPARを介して主作用に特異的に寄与し、副作用を惹起しない物質を検出する新しいインスリン抵抗性改善薬の同定およびスクリーニング方法を提供し本発明を完成した。

すなわち、本発明は、

- (1) 糖代謝改善作用惹起効果の高いPPARリガンド存在下で、バイト(bait)として配列番号2で表されるPPAR γ 蛋白質の少なくとも第204番目から505番目を含む領域をコードするポリヌクレオチドを用い、プレイ(pre)としてcDNAライブラリーを用いる酵母ツーハイブリッドシステムを利用した、リガンド依存的にPPAR γ と相互作用する蛋白質をスクリーニングする方法、
- (2) 浮腫惹起効果の高いPPARリガンド存在下で、バイト(bait)として配列番号2で表されるPPAR γ 蛋白質の少なくとも第204番目から505番目を含む領域をコード

するポリヌクレオチドを用い、プレイ (prey) としてcDNAライブラリーを用いる酵母ツーハイブリッドシステムを利用した、リガンド依存的にPPAR γ と相互作用する蛋白質をスクリーニングする方法、

(3) i) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1~10個のアミノ酸が欠失、置換、及び/または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARと相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ii) 配列番号2または配列番号6で表されるPPAR蛋白質の少なくともリガンド結合領域と転写因子のDNA結合領域とからなる融合蛋白質をコードする遺伝子、及び、iii) 前記転写因子のDNA結合領域が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞、

あるいは、

i) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1~10個のアミノ酸が欠失、置換、及び/または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARと相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及びii) 配列番号2または配列番号6で表されるPPAR蛋白質が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換され、a) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1~10個のアミノ酸が欠失、置換、及び/または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARと相互作用するポリペプチド、及び、b) 配列番号2または配列番号6で表されるPPAR蛋白質を発現している細胞、

(4) i) 配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号8で表されるアミノ酸配列において、1~10個のアミノ酸が欠失、置換、及び/または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARと相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ii) 配列番号2または配列番号6で表されるPPAR蛋白質の少なくともリガンド結合領域と転写因子のDNA結合領域からなる融合蛋白質をコードする遺伝子、及び、iii) 該転写因子のDNA結合領

域が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞、

あるいは、

i) 配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号8で表されるアミノ酸配列において、1~10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARと相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及びii) 配列番号2または配列番号6で表されるPPAR蛋白質が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換され、a) 配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号8で表されるアミノ酸配列において、1~10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARと相互作用するポリペプチド、及び、b) 配列番号2または配列番号6で表されるPPAR蛋白質を発現している細胞、

(5) 転写因子が酵母のGAL4蛋白質である (3) または (4) 記載の細胞、

(6) レポーター遺伝子がルシフェラーゼ遺伝子である (3) または (4) 記載の細胞、

(7) i) (3) に記載の細胞、PPARリガンド、及び被験物質を接触させる工程、及び、ii) レポーター遺伝子の発現を指標として該リガンド依存的な相互作用の変化または該リガンド依存的なPPARの転写活性誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、被験物質がPPARを介した糖代謝改善作用を促進するか否かを検出する方法、

(8) i) (3) に記載の細胞、PPARリガンド、及び被験物質を接触させる工程、及び、ii) レポーター遺伝子の発現を指標として該リガンド依存的な相互作用の変化または該リガンド依存的なPPARの転写活性誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、インスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法、

(9) インスリン抵抗性改善薬が糖代謝改善剤である (8) 記載のスクリーニング方法、

(10) i) (4) に記載の細胞に被験物質を接触させる工程、及び、ii) レポーター遺伝子の発現を指標として該被験物質による相互作用の変化または該被験物質に

よるPPARの転写活性誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、被験物質がPPARを介する浮腫惹起活性を促進するか否かを検出する方法、

(11) i) (4)に記載の細胞に被験物質を接触させる工程、ii) レポーター遺伝子の発現を指標として該被験物質による相互作用の変化または該被験物質によるPPARの転写活性誘導活性の変化を分析する工程、及びiii) レポーター活性を増大させない被験物質を選択する工程を含むことを特徴とする、浮腫惹起活性のないインスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法、

(12) インスリン抵抗性改善薬が糖代謝改善剤である (11) 記載のスクリーニング方法

(13) i) 配列番号17で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号17で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARと相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ii) 配列番号2または配列番号6で表されるPPAR蛋白質の少なくともリガンド結合領域と転写因子のDNA結合領域とからなる融合蛋白質をコードする遺伝子、及び、iii) 前記転写因子のDNA結合領域が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞、

あるいは、

i) 配列番号17で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号17で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARと相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及びii) 配列番号2または配列番号6で表されるPPAR蛋白質が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換され、a) 配列番号17で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号17で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARと相互作用するポリペプチド、及び、b) 配列番号2または配列番号6で表されるPPAR蛋白質を発現している細胞、

(14) i) (13)に記載の細胞に被験物質を接触させる工程、及び、ii) レポータ

一遺伝子の発現を指標として該被験物質による相互作用の変化または該被験物質によるPPARの転写活性誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、被験物質がPPARを介した糖代謝改善作用を促進するか否かを検出する方法、

(15) i) (13) に記載の細胞に被験物質を接触させる工程、及び、ii) レポーター遺伝子の発現を指標として該被験物質による相互作用の変化または該被験物質によるPPARの転写活性誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、インスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法、

(16) インスリン抵抗性改善薬が糖代謝改善剤である (15) 記載のスクリーニング方法、

(17) i) 配列番号26で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド、あるいは配列番号26で表される塩基配列において、1~10個の塩基が欠失、置換、及び／または挿入されたポリヌクレオチド配列を含みかつ転写プロモーター活性を有するポリヌクレオチド

に融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞に被験物質を接触させる工程、及び、ii) レポーター遺伝子の発現を指標として被験物質による転写活性誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、インスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法、

(18) レポーター遺伝子がルシフェラーゼ遺伝子である (17) に記載の方法、

(19) (8)、(11)、(15) 及び／又は (17) に記載のスクリーニング方法を用いてスクリーニングする工程、及び

前記スクリーニングにより得られた物質を用いて製剤化する工程

を含むことを特徴とする、インスリン抵抗性改善用医薬組成物の製造方法に関する。

配列番号 4 からなる ECHLP の全長又は部分配列と高い相同性を有するアミノ酸配列及び該配列をコードする塩基配列については種々の報告 (W000/55350、W002/29103、W002/00677、W001/49716、W000/37643、W001/75067) があるが、いずれにも ECHLP がインスリン抵抗性に関与するとの記載はない。配列番号 8 からなる AOP2 の全長又は部分配列及びそれらと高い相同性を有するアミノ酸配列及び該配列をコードする塩基配列については種々の報告 (W098/43666、Antioxid

Redox Signal. 1999 Winter;1(4):571-84. Review.、W0200212328、W0200229086、W0200206317)があるが、いずれにも AOP2 がインスリン抵抗性に関与するとの記載はない。W001/55301 には本発明者らが同定した AOP2 と同一の配列が示され、該配列の機能を調整する物質の用途として多数の疾患の治療が列挙された中に糖尿病治療が含まれるが、該配列が糖尿病に関与するとの裏付けの実施例及び記載はない。配列番号 17 からなる FLJ13111 と同一のアミノ酸配列及び該配列をコードする塩基配列については、EP1074617 において開示されているが、同報告においては FLJ13111 の関与する特定の疾患名の記載がない。FLJ13111 の塩基配列と相同性を有する配列は W000/58473 に開示されており、該配列の機能を調整する物質の用途として多数の疾患の治療が列挙された中に糖尿病治療が含まれるが、該配列が糖尿病に関与するとの裏付けの実施例及び記載はない。従って、ECHLP、AOP2、及び FLJ13111 が PPAR と結合することは本発明者らが初めて見出した知見であり、更には、これらを用いることにより PPAR を介して主作用に特異的に寄与し、副作用を惹起しない物質を検出する新しいインスリン抵抗性改善薬スクリーニングは本願発明者らが初めて行った発明である。

図面の簡単な説明

図1は、リガンド依存的なPPAR γ 相互作用因子とPPAR γ の結合におけるアゴニスト選択性を示す図である。

図2は、糖尿病モデルマウスKKA γ /Ta (KKA γ) およびC57BL/KsJ-db/db (db/db) と正常マウスにおけるEch1発現量の比較を示す図である。

図3は、Ech1の組織別発現分布を示す図である。

図4は、ECHLPによるPPAR γ のリガンド依存的転写誘導能に対する抑制作用を示す図である。

図5は、AOP2によるPPAR γ のリガンド依存的転写誘導能に対する促進作用を示す図である。

図6は、ECHLP、AOP2によるPPAR γ のリガンド依存的転写誘導能に対する作用を利用した主作用特異的なPPAR γ リガンドのスクリーニングを示す図である。

図7は、FLJ13111によるPPAR γ のリガンド依存的転写誘導能に対する促進作用を

示す図である。

図 8 は、糖尿病モデルマウス KKA^y/Ta (KKA^y)、 $C57BL/KsJ-db/db$ (db/db) および正常マウス ($C57BL/6J$ ($C57BL$)、 $C57BL/KsJ-m/m$ ($m+/m+$)) における FLJ13111 発現量の比較を示す図である。

図 9 は、FLJ13111 プロモーターの転写誘導活性及び該活性に及ぼすピオグリタゾン又は FLJ13111 過剰発現の影響を示す図である。

図 10 は、マウス 3T3-L1 細胞におけるピオグリタゾンによるトリグリセリド含量の増加に対する ECHLP 過剰発現の影響を示す図である。

図 11 は、FLJ13111 存在あるいは非存在下におけるピオグリタゾン又は化合物 XF に依存した PPAR γ の転写誘導能を示す図である。

図 12 は、腎上皮細胞におけるナトリウム-カリウム ATP 分解酵素の発現量に対するピオグリタゾンあるいは化合物 XF の影響を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明で使用される用語につき説明する。

本明細書中で使用される「主作用」は「糖代謝改善作用」を、「副作用」は「浮腫を惹起する作用」を表す。糖代謝改善作用とは、細胞内に血液中の糖(グルコース)を取り込んでエネルギーとして消費したり、グリコーゲンのようなエネルギー貯蔵物質として蓄積する機能を促進する作用をいう。浮腫を惹起する作用とは、細胞外液が間質に蓄積、貯留して浮腫(むくみ)を惹起させる効果をいう。

「主作用リガンド」は「糖代謝改善作用(主作用)惹起効果の高いリガンド」を、「副作用リガンド」は「浮腫(副作用)惹起効果の高いリガンド」を表す。糖代謝改善作用惹起効果の高いリガンドとしては、Miwa 1らの血糖測定法 (Glin Chim Acta 37巻538頁1972年) において、より好ましくは、実施例 1 の条件の下で、対照群に比較して血糖値を25%低下させるのに必要な化合物濃度が従来型のPPAR γ リガンド(例えばピオグリタゾン)に比較して、5分の1以下の低濃度、より好ましくは、10分の1以下の低濃度であるものが好ましい。例えば、後述のGW-7282や GI-262570などを例示できる。なおMiwa 1らの血糖測定法とは、ムタローゼとグ

ルコースオキシダーゼを組み合わせた酵素法により血糖値を測定するものである。浮腫惹起効果の高いリガンドとしては、Brizzee BLらの循環血漿量測定法 (J. Appl. Physiol. 69(6): 2091-2096, 1990) において、より好ましくは実施例1の条件の下で、100mg/kgの化合物を投与したときに二週間で対照群に比較して25%以上の循環血漿量の増大をもたらすもの、あるいは従来型のPPAR γ リガンド(例えばピオグリタゾン)に比較して15%以上の循環血漿量の増大をもたらすものが好ましい。例えば、後述のGW-7282やGL-100085などを例示できる。

「試験用細胞」は「PPARとPPAR相互作用ECHLPとのリガンド依存的な相互作用をレポーター遺伝子の発現を指標として測定できる細胞」、「PPARとPPAR相互作用AOP2とのリガンド依存的な相互作用をレポーター遺伝子の発現を指標として測定できる細胞」、または「PPARとPPAR相互作用FLJ13111とのリガンド依存的な相互作用をレポーター遺伝子の発現を指標として測定できる細胞」を表す。「酵母ツーハイブリッドシステム」は、酵母の転写活性化因子にはDNA結合領域と転写活性化領域が存在し、転写活性化の開始には両者の相互作用が必要であることを利用し、①前記DNA結合領域に結合させた標的蛋白質と②前記転写活性化領域に結合させた蛋白質の相互作用を検出するシステムである。酵母ツーハイブリッドシステムにおいて、バイト(bait)はDNA結合領域に結合させた標的蛋白質を、プレイ(pre)は転写活性化領域に結合させた蛋白質を示す。「cDNAライブラリー」とは、細胞内で合成されている数万種類のmRNA(遺伝子情報の写しでタンパク質のアミノ酸配列を指令する)を抽出・分離し、逆転写酵素によりそのmRNAに相補なDNAを合成し、末端の加工をへてベクターへ組み込んだものである。本明細書において、「PPARリガンド結合領域」はPPARのリガンドが結合する領域であって、配列番号2記載のヒトPPAR γ 2アミノ酸配列では第204番から第505番目までを含む領域、ヒトPPAR α アミノ酸配列では第167番から第468番目までを含む領域をそれぞれ示す。「DNA結合領域」は、DNAに結合するために機能する領域であり、応答配列に対するDNA結合能を有するが、単独で転写活性化能を有しないものを示す。GAL4転写因子のDNA結合領域は、N末端側(およそ第1番目から147番目までのアミノ酸を含む領域)に存在する。

以下、本発明を詳細に説明する。

本明細書の試験用細胞作製用のPPAR相互作用蛋白質遺伝子に含まれるポリヌクレオチドによりコードされるPPAR相互作用ポリペプチドには、

- (1) 配列番号4、配列番号8、または配列番号17で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；
- (2) 配列番号4、配列番号8、または配列番号17で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARに結合する蛋白質であるポリペプチド(以下、機能的等価改変体と称する)；及び
- (3) 配列番号4、配列番号8または配列番号17で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列からなり、しかも、リガンド依存的にPPARに結合する蛋白質であるポリペプチド(以下、相同ポリペプチドと称する)；が含まれる。

機能的等価改変体としては、「配列番号4、配列番号8、または配列番号17で表されるアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARに結合する蛋白質であるポリペプチド」、「配列番号4または配列番号17で表されるアミノ酸配列において、1～10個、好ましくは1～7個、より好ましくは1～5個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、主作用リガンド依存的にPPARに結合する蛋白質であるポリペプチド」あるいは「配列番号8で表されるアミノ酸配列において、1～10個、好ましくは1～7個、より好ましくは1～5個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、副作用リガンド依存的にPPARに結合する蛋白質であるポリペプチド」が好ましい。

相同ポリペプチドは、配列番号4、配列番号8、または配列番号17で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列からなり、しかも、リガンド依存的にPPARに結合する蛋白質である限り、特に限定されるものではないが、配列番号4または配列番号17で表されるアミノ酸配列に関して、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなることができ、好ましくは主作用リガンド依存的にPPARに結合する蛋白質であり、配列番号8で表されるアミノ酸配列に関して、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上の相同性を有するアミ

ノ酸配列からなることができ、好ましくは副作用リガンド依存的にPPARに結合する蛋白質である。なお、本明細書における前記「相同性」とは、Clustal program(Higgins and Sharp, Gene 73, 237-244, 1998; Thompson et al. Nucleic Acid Res. 22, 4673-4680, 1994)検索によりデフォルトで用意されているパラメータを用いて得られた値を意味する。前記のパラメータは以下のとおりである。

Pairwise Alignment Parametersとして

K tuple 1

Gap Penalty 3

Window 5

Diagonals Saved 5

以上、本明細書の試験用細胞に含まれるPPAR相互作用ポリペプチドについて説明したが、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、その機能的等価改変体、及びその相同ポリペプチドを総称して、以下、「PPAR相互作用ECHLP」と称する。配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、その機能的等価改変体、及びその相同ポリペプチドを総称して、以下、「PPAR相互作用AOP2」と称する。また、配列番号17で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、その機能的等価改変体、及びその相同ポリペプチドを総称して、以下、「PPAR相互作用FLJ13111」と称する。

また、PPAR相互作用ECHLP、PPAR相互作用AOP2、またはPPAR相互作用FLJ13111をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドは、配列番号4、配列番号8、または配列番号17記載のアミノ酸配列で示されるポリヌクレオチド、その機能的等価改変体、または、その相同ポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドなら何れでもよい。好ましくは、配列番号4、配列番号8、または配列番号17記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドであり、さらに好ましくは、配列番号3、配列番号7、または配列番号16記載の塩基配列である。

本発明の、副作用と乖離したインスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする為に有用なツールとなるリガンド依存的にPPARと相互作用する蛋白質をスクリーニ

ングする方法、該蛋白質を利用した副作用と乖離したインスリン抵抗性改善薬のスクリーニング方法を以下に記載する。

＜リガンド依存的にPPARと相互作用する蛋白質のスクリーニング方法＞

本発明においては、PPAR γ とリガンド依存的に相互作用する因子を酵母ツーハイブリッドシステムを利用したレポーター遺伝子の発現を指標としてcDNAライブラリー中から網羅的に同定することができる。本発明ではPPARとその転写共役因子のリガンド依存的な相互作用を検出し、PPAR自身の転写誘導能の検出を必要としないため、同転写誘導能発現に関与する哺乳動物固有の因子群の存在を要しない。従って試験用細胞として特に哺乳動物細胞を用いる必要がなく、真核細胞、例えば、酵母細胞、昆虫細胞及び哺乳動物細胞などでもよい。これらのうち、酵母細胞は培養が容易で迅速に実施できる上、外来遺伝子の導入など遺伝子組換え技術を適用するのが容易である。またPPARと相互作用因子との結合におけるリガンド依存性は同じ酵母ツーハイブリッドシステムを利用した方法で効率よく追試、検出することができる。

酵母ツーハイブリッドシステムは、レポーター遺伝子の発現をマーカーとして蛋白-蛋白質間相互作用を検出する方法である。一般に転写因子はDNA結合領域と転写活性化領域という機能の異なる2つの領域を有するが、ツーハイブリッドシステムでは、2種類の蛋白質XとYの相互作用を調べるために、転写因子のDNA結合領域とXからなる融合蛋白質、および、転写因子の転写活性化領域とYからなる融合蛋白質の2種類を同時に酵母細胞内で発現させる。蛋白質XとYが相互作用すると2種類の融合蛋白質が1つの転写複合体を形成し、これが細胞の核内において該転写因子の応答配列(特異的に結合するDNAの部位)と結合してその下流に配置されたレポーター遺伝子の転写を活性化する。このように2つの蛋白質の相互作用をレポーター遺伝子の発現に置き換えて検出することができる。

酵母ツーハイブリッドシステムは、通常、特定の蛋白質をプローブとしてこれと相互作用する未知蛋白質の遺伝子同定に用いられる。しかしながら核内受容体とその一部の転写共役因子群に見られるような、両者の結合が受容体リガンドの存在に依存して起こる場合には、リガンドを外部から添加したツーハイブリッドシステムを用いる必要がある。しかしながら、従来の技術の項で前述した通り、酵

母ツーハイブリッドシステムではPPAR γ と相互作用因子のリガンド依存性の検出が困難であり、リガンド依存性のPPAR γ 相互作用因子の網羅的なスクリーニングは成功していなかった。この理由を本発明者らは、酵母の性質上PPAR γ アゴニストの細胞内へ透過性が低く、リガンド依存性の検出感度が低いためと予見し、報告された中でPPAR γ アゴニストとして最も活性の高い化合物群を高濃度で酵母に作用させることにより、PPAR γ と相互作用因子のリガンド依存性の検定やスクリーニングに適用できる酵母ツーハイブリッドシステムの独自の方法を完成した。より具体的には実施例2に記載の方法で本スクリーニングを実施できる。

PPAR γ のリガンド依存的相互作用因子を検出し、該相互作用に対する被験物質の作用を測定することを特徴とする方法の別の実施態様としては、例えば、PPAR γ と相互作用因子とのリガンド依存的結合を、生化学的に検出する方法がある。このような方法では、例えばRIなどで標識した培養細胞の抽出液から、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、プロテインA、 β -ガラクトシダーゼ、マルトース-バインディングプロテイン(MBP)など適当なタグ蛋白質とPPAR γ のリガンド結合領域からなる融合タンパク質と結合する蛋白質を被験物質の存在下で直接的に検出し、該結合蛋白質を精製し、アミノ酸配列決定により同定することで実施できる。

<リガンド依存的にPPARと相互作用する蛋白質を利用した、糖代謝改善作用の検出方法・インスリン抵抗性改善薬のスクリーニング方法；リガンド依存的にPPARと相互作用する蛋白質を利用した、浮腫惹起活性の検出方法・浮腫惹起活性のないインスリン抵抗性改善薬のスクリーニング方法>

1. PPAR相互作用ECHLPを利用した糖代謝改善作用の検出法・インスリン抵抗性改善薬スクリーニング法

本発明の一つの実施態様としては、(i)PPAR α または γ の少なくともリガンド結合領域と転写因子のDNA結合領域の融合遺伝子、あるいはPPAR α または γ 分子の全長域をコードする遺伝子、(ii)PPAR相互作用ECHLPをコードする遺伝子、及び(iii)該転写因子のDNA結合領域が結合し得る応答配列に連結されたレポーター遺伝子、あるいはPPAR α または γ が結合し得る応答配列に連結されたレポーター遺伝子で形質転換された試験用細胞を用い、PPARリガンド存在下でこれを被験物質

と共存させ、試験用細胞における、PPAR相互作用ECHLPによるPPARの転写活性化能抑制作用の被験物質による変化をレポーター遺伝子の発現を指標として検出し、測定することからなるPPARを介する主作用を選択的に促進するか否かの検出方法が挙げられる。また、同検出方法により検出するレポーター活性を増大させる化合物を選択することにより、PPARを介する主作用を選択的に促進する化合物をスクリーニングする方法が挙げられる。

2. PPAR相互作用AOP2を利用した浮腫惹起活性の検出法・浮腫惹起活性のないインスリン抵抗性改善薬のスクリーニング法

本発明の一つの実施態様としては、(i)PPAR α または γ の少なくともリガンド結合領域と転写因子のDNA結合領域の融合遺伝子、あるいはPPAR α または γ 分子の全長域のコード遺伝子(ii)PPAR相互作用AOP2のコード遺伝子、及び(iii)該転写因子のDNA結合領域が結合し得る応答配列に連結されたレポーター遺伝子、あるいはPPAR α または γ が結合し得る応答配列に連結されたレポーター遺伝子で形質転換された試験用細胞を用い、これを被験物質と共存させ、試験用細胞における、PPAR相互作用AOP2によるPPARの転写活性化能促進作用の被験物質による変化をレポーター遺伝子の発現を指標として検出し、測定することからなるPPARを介する副作用を有する化合物を検出する方法、同レポーター系により、副作用と乖離した、主作用を選択的に促進する化合物を選択、スクリーニングする方法が挙げられる。

3. PPAR相互作用FLJ13111を利用した糖代謝改善作用の検出法・インスリン抵抗性改善薬スクリーニング法

本発明の一つの実施態様としては、(i)PPAR γ の少なくともリガンド結合領域と転写因子のDNA結合領域の融合遺伝子、あるいはPPAR γ 分子の全長域をコードする遺伝子、(ii)PPAR相互作用FLJ13111をコードする遺伝子、及び(iii)該転写因子のDNA結合領域が結合し得る応答配列に連結されたレポーター遺伝子、あるいはPPAR α または γ が結合し得る応答配列に連結されたレポーター遺伝子で形質転換された試験用細胞を用い、これを被験物質と共存させ、試験用細胞における、PPAR相互作用FLJ13111によるPPARの転写活性化亢進作用の被験物質による変化をレポーター遺伝子の発現を指標として検出し、測定することからなるPPARを介す

る主作用を選択的に促進するか否かの検出方法が挙げられる。また、同検出方法により検出するレポーター活性を増大させる化合物を選択することにより、PPARを介する主作用を選択的に促進する化合物をスクリーニングする方法が挙げられる。

上記1、2、または3の実施態様において、PPARの転写誘導能を検出するために用いられる転写因子は、細胞核内で特定のDNA配列に結合する領域を有する真核生物の転写因子であれば限定されない。また転写因子のDNA結合領域は、応答配列に対するDNA結合能は有するが、単独で転写活性化能を有しないものであればよい。このような転写因子としては、例えば、酵母のGAL4蛋白質(Keeganら、Science、第231巻、第699-704頁、1986年、Maら、Cell、第48巻、第847-853頁、1987年)が挙げられる。GAL4転写因子のDNA結合領域および転写活性化領域は、例えばGAL4の場合、N末端側(およそ第1番目から147番目までのアミノ酸を含む領域)に存在する。

応答配列は、転写因子のDNA結合領域が結合し得るDNA配列を用いる。遺伝子の上流域からその領域を切り出して用いる、あるいはその配列を化学合成により合成して用いてもよい。

応答配列の下流に配置されるレポーター遺伝子は、一般に用いられるものであれば特に限定されないが、定量的測定が容易な酵素遺伝子などが好ましい。例えば、バクテリアトランスポゾン由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子(CAT)、ホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子(Luc)、クラゲ由来の緑色蛍光蛋白質遺伝子(GFP)等があげられる。レポーター遺伝子は、応答配列の下流に機能的に連結される。

PPAR α または γ 、転写因子のDNA結合領域、PPAR相互作用ECHLP、PPAR相互作用AOP2、またはPPAR相互作用FLJ13111をコードするポリヌクレオチドは、既知のアミノ酸配列や塩基配列の情報などをもとに設計し合成したプライマーやプローブを用いて、PCR(Polymerase Chain Reaction)法やハイブリダイゼーションによるスクリーニングにより、cDNAライブラリーから単離できる。PPAR相互作用ECHLPは、同じ分子種として同定されるもので、PPARとリガンド依存的に相互作用して該受容体の転写誘導能に影響を与えるものであればいずれの種由来のものであ

てもよく、例えばヒト(LOC115289 ; GenBank accession 番号XM_008904、 HPXEL ; GenBank accession 番号U16660、FitzPatrick DRら、Genomics 1995 年27巻(3):457-466頁)、マウス(Ech1 ; GenBank accession 番号NM_016772)、ラット(HPXEL ; GenBank accession 番号NM_022594、FitzPatrick DRら、Genomics 1995 年27巻(3):457-466頁)などの哺乳動物由来のものが挙げられる。

PPAR 相互作用 AOP2 は、同じ分子種として同定されるもので、PPAR とリガンド依存的に相互作用して該受容体の転写誘導能に影響を与えるものであればいずれの種由来のものであってもよく、例えばヒト(AOP2/KIAA0106 ; GenBank accession 番号 XM_001415、D14662)、マウス(AOP2/ 1-Cys Prx/ nonselenium glutathione peroxidase ; GenBank accession 番号 AF004670、AF093852、Y12883)、ラット(AOX2 ; GenBank accession 番号 AF014009)、ウシ(GPX/ PHGPx ; GenBank accession 番号 AF080228、AF090194)などの哺乳動物由来のものが挙げられる。

PPAR 相互作用 FLJ13111 は、同じ分子種として同定されるもので、PPAR とリガンド依存的に相互作用して該受容体の転写誘導能に影響を与えるものであればいずれの種由来のものであってもよく、例えばヒト(FLJ13111 ; GenBank accession 番号 AK023173、NM_025082)、マウス(ヒト FLJ13111 様蛋白質 ; GenBank accession 番号 XM_134598)などの哺乳動物由来のものが挙げられる。

PPAR γ は、同じ分子種として同定されるもので、核内レセプターとしての生体内での機能を果たすものであればいずれの種由来のものであってもよく、例えばヒト、マウス、ラットなどの哺乳動物由来のもの他、アフリカツメガエル由来のものなどが挙げられる。PPAR γ (Dreyer ら、Cell、第 68 巻、第 879-887 頁、1992 年、Zhu ら、Journal of Biological Chemistry、第 268 巻、第 26817-26820 頁、1993 年、Kliwer ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第 91 巻、第 7355-7359 頁、1994 年、Mukherjee ら、Journal of Biological Chemistry、第 272 巻、第 8071-8076 頁、1997 年、Elbrecht ら、Biochem. Biophys. Res. Commun.、第 224 巻、第 431-437 頁、1996 年、Chem ら、Biochem. Biophys. Res. Commun.、第 196 巻、第 671-677 頁、1993 年、Tontonoz ら、Genes & Development、第 8 巻、第 1224-1234 頁、1994 年、Aperlo ら、Gene、第 162 巻、第 297-302 頁、1995 年)の遺伝

子配列およびアミノ酸配列はすでに報告されている。また、PPAR γ には、PPAR γ 1及びPPAR γ 2の二種のアイソフォームが存在し、PPAR γ 1はPPAR γ 2と比較するとN末端側の30アミノ酸が欠失しているが、その他のアミノ酸配列は全く同じであり、いずれも脂肪組織に発現していることが知られている。

PPAR α 若しくは γ 、転写因子のDNA結合領域、PPAR相互作用ECHLP、PPAR相互作用AOP2、またはPPAR相互作用FLJ13111をコードするポリヌクレオチドは、例えば次のように得ることができるが、この方法に限らず公知の操作「Molecular Cloning」[Sambrook, Jら、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年]でも得ることができる。

該蛋白質を産生する能力を有する細胞あるいは組織、例えば脂肪組織から該蛋白質をコードするものを包含するmRNAを既知の方法により抽出する。抽出法としては、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネート-グアニジン・塩酸法等が挙げられるが、好ましくはグアニジン・チオシアネート塩化セシウム法が挙げられる。PPAR α 若しくは γ 、PPAR相互作用ECHLP、PPAR相互作用AOP2、またはPPAR相互作用FLJ13111の産生能力を有する細胞あるいは組織は、該蛋白質をコードする塩基配列を有する遺伝子あるいはその一部を用いたノーザンブロッティング法、該蛋白質に特異的な抗体を用いたウエスタンブロッティング法などにより特定することができる。

mRNAの精製は常法に従えばよく、例えばmRNAをオリゴ(dT)セルロースカラムに吸着・溶出させ、精製することができる。さらに、ショ糖密度勾配遠心法等によりmRNAをさらに分画することもできる。また、mRNAを抽出せずとも、市販されている抽出済mRNAを用いても良い。

次に、精製されたmRNAをランダムプライマー又はオリゴdTプライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行い、第1鎖cDNAを合成する。この合成は常法によって行うことができる。得られた第1鎖cDNAを用い、目的遺伝子の一部の領域をはさんだ2種類のプライマー、例えばPPAR γ には配列番号9と配列番号10、PPAR相互作用ECHLPには配列番号12と配列番号13、PPAR相互作用AOP2には配列番号14と配列番号15、PPAR相互作用FLJ13111には配列番号18と配列番号19を用いてPCRに供し、目的とする遺伝子配列を増幅する。また、市販のcDNAライブラリーを用い、同様

の目的遺伝子の一部の領域をはさんだ2種類のプライマーを用いてPCRに供し、目的とする遺伝子配列を増幅することもできる。得られたDNAをアガロースゲル電気泳動等により分画する。所望により、上記DNAを制限酵素等で切断し、接続することによって目的とするDNA断片を得ることもできる。具体的には実施例2, 4, 5, 7, 8, 10, 11記載の方法により得られる。

これまで述べた方法により得られるDNAの配列決定は、例えば、マキシム-ギルバートの化学修飾法 (Maxam, A. M. 及び Gilbert, W., "Methods in Enzymology", 65, 499-559, 1980) やジデオキシヌクレオチド鎖終結法 (Messing, J. 及び Vieira, J., Gene, 19, 269-276, 1982) 等により行なうことができる。

「Molecular Cloning」 [Sambrook, Jら、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年] に記載の方法により、これら各領域をコードするDNAを単独、あるいは連結し、適当なプロモーターの下流に連結することでPPAR α または γ 及びPPAR相互作用ECHLPの試験細胞内での発現系、並びに、PPAR α または γ 及びPPAR相互作用AOP2の試験細胞内での発現系が構築できる。同様にしてPPAR γ 及びPPAR相互作用FLJ13111の試験細胞内での発現系が構築できる。

具体的には上述のように得られたポリヌクレオチドは、適当なベクタープラスミドに組み込み、プラスミドの形で宿主細胞に導入すればよい。これらは、両者が一つのプラスミド上に含まれるよう構成してもよく、あるいは各々別々のプラスミド上に含まれるよう構成してもよい。あるいは、このような構成が染色体DNAに組み込まれた細胞を取得してこれを用いてもよい。

応答配列に連結されたレポーター遺伝子も、一般的な遺伝子組換え技術を用いて構築し、この構成をベクタープラスミド中に組込んだ上、得られた組換えプラスミドを宿主細胞中に導入したものを用いる。あるいは、このような構成が染色体DNAに組み込まれた細胞を取得してこれを用いてもよい。

PPARは外部から導入しても良いが、内在性のPPAR γ が豊富に存在する脂肪由来細胞、あるいは腎由来細胞を宿主細胞として用いる場合は、上述の構成のうち、PPAR γ を省いて、応答配列に連結されたレポーターとPPAR相互作用ECHLPからなる構成のみ、PPAR γ を省いて、応答配列に連結されたレポーターとPPAR相互作用AOP2からなる構成のみ、あるいは、PPAR γ を省いて、応答配列に連結されたレポ

ーターとPPAR相互作用FLJ13111からなる構成のみを導入してもよい。

より具体的には、単離されたポリヌクレオチドを含む断片は、適当なベクタープラスミドに再び組込むことにより、真核生物及び原核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらに、これらのベクターに適当なプロモーターおよび形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現させることが可能である。

例えば、真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えばサルの細胞であるCOS細胞 (Gluzman, Y. (1981) *Cell*, 23, 175-182) やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO) のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株 (Urlaub, G. and Chasin, L. A. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 4216-4220)、ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞および同細胞に Epstein Barr VirusのEBNA-1遺伝子を導入した293-EBNA細胞 (Invitrogen社製) 等がよく用いられているが、これらに限定されるわけではなく、PPAR相互作用ECHLP1によるPPAR α または γ の転写誘導能阻害、PPAR相互作用AOP2によるPPAR α または γ の転写誘導活性、あるいはPPAR相互作用FLJ13111によるPPAR γ の転写誘導活性を検出できるものであればよい。

脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列等を有するものを使用でき、これはさらに必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40の初期プロモーターを有するpSV2dhfr (Subramani, S. et al. (1981) *Mol. Cell. Biol.*, 1, 854-864)、ヒトのelongation factorプロモーターを有するpEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18, 5322)、cytomegalovirusプロモーターを有するpCEP4 (Invitrogen社製) 等を例示できるが、これに限定されない。

宿主細胞として、COS細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40複製起点を有し、COS細胞において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、転写終結シグナルおよびRNAスプライス部位を備えたものを用いることができ、例えば、pME18S、(Maruyama, K. and Takebe, Y. (1990) *Med. Immunol.*, 20, 27-32)、pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990)

Nucleic Acids Res., 18, 5322)、pCDM8(Seed, B. (1987) Nature, 329, 840-842) 等が挙げられる。該発現ベクターはDEAE-デキストラン法(Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) Nucleic Acids Res., 11, 1295-1308)、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法(Graham, F. L. and van der Ed, A. J. (1973) Virology, 52, 456-457)、FuGENE6(Boeringer Mannheim社製)を用いた方法、および電気パルス穿孔法(Neumann, E. et al. (1982) EMBO J., 1, 841-845)等によりCOS細胞に取り込ませることができ、かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。

また、宿主細胞としてCHO細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、G418耐性マーカーとして機能するneo遺伝子を発現し得るベクター、例えばpRSVneo(Sambrook, J. et al. (1989): "Molecular Cloning-A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY)やpSV2-neo(Southern, P. J. and Berg, P. (1982) J. Mol. Appl. Genet., 1, 327-341)等をコトランスフェクトし、G418耐性のコロニーを選択することにより該蛋白質群を安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞として293-EBNA細胞を用いる場合には、Epstein Barr Virusの複製起点を有し、293-EBNA細胞で自己増殖が可能なpCEP4(Invitrogen社)などの発現ベクターを用いて所望の形質転換細胞を得ることができる。

上記で得られる所望の形質転換体は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞内に目的の蛋白質群が生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば上記COS細胞であればRPMI-1640培地やダルベッコ修正イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地に必要に応じ牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したものを使用できる。また、上記293-EBNA細胞であれば牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したダルベッコ修正イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地にG418を加えたものを使用できる。

試験用細胞を被験物質の存在下で培養し、PPAR α または γ の転写誘導能に対するPPAR相互作用ECHLPの抑制作用が被験物質により阻害されることをレポーター遺伝子の発現により検出し測定することができる。①被験物質がPPAR相互作用ECHLPあるいはPPARに作用し、その作用に依存してPPAR相互作用ECHLPのPPAR転写

誘導活性に対する抑制効果の減弱を生じるとき、発現するレポーター活性の増大が観察される。このような被験物質は、PPARの主作用促進剤として同定される。また、例えば②被験物質がPPARと結合して転写誘導能を促進し、一方でPPAR相互作用ECHLPによる抑制効果を阻害するとき、発現するレポーター活性の増大が観察される。このような被験物質はPPARの主作用特異的アゴニストとして同定される。また、例えば③被験物質がPPAR相互作用ECHLPと結合してPPARの転写誘導能抑制効果を阻害するとき、あるいは被験物質がPPAR相互作用ECHLPの発現を阻害したり分解を促進するとき、やはり発現するレポーター活性の増大が観察される。このような物質はPPARの主作用を促進するPPAR相互作用ECHLP阻害剤として同定される。これら①、②及び③はいずれもPPARアゴニストがもたらす副作用と乖離したインスリン抵抗性改善薬として作用することが期待される。より具体的には実施例5、9に記載の方法でインスリン抵抗性改善薬を同定・スクリーニングできる。例えば、実施例9に記載の条件で、IC₅₀が10 μ M以下の物質を、好ましくは1 μ M以下の物質をインスリン抵抗性改善薬として選択することができる。

試験用細胞を被験物質の存在下で培養し、PPAR α または γ の転写誘導能に対するPPAR相互作用AOP2の促進作用が被験物質により抑制されることをレポーター遺伝子の発現により検出し測定することができる。①被験物質がPPAR相互作用AOP2あるいはPPAR γ に作用し、その作用に依存してPPAR相互作用AOP2のPPAR γ 転写誘導活性に対する促進効果の減弱を生じるとき、発現するレポーター活性の減少が観察される。このような被験物質は、PPAR γ の副作用を抑制する物質として同定される。また、例えば②被験物質がPPAR γ と結合して転写誘導能を促進し、一方でPPAR相互作用AOP2による促進効果を阻害するとき、発現するレポーター活性はPPAR相互作用AOP2を共発現させない状態と同じレベルにまで減少することが観察される。このような被験物質はPPAR γ の、副作用と乖離した主作用選択的アゴニストとして同定される。また、例えば③被験物質がPPAR相互作用AOP2と結合してPPAR γ の転写誘導能促進効果を阻害するとき、あるいは被験物質がPPAR相互作用AOP2の発現を阻害したり分解を促進するとき、やはり発現するレポーター活性の減少が観察される。このような物質はPPAR γ の副作用を抑制するPPAR相互作用AOP2阻害剤として同定される。これらはいずれもPPAR γ アゴニストがもたらす副

作用と乖離したインスリン抵抗性改善薬として作用することが期待される。一方で、例えば被験物質がPPAR相互作用AOP2あるいはPPAR γ に作用し、その作用に依存してPPAR相互作用AOP2のPPAR γ 転写誘導活性に対する促進効果を亢進させるとき、発現するレポーター活性の増大が観察される。このような被験物質はPPAR γ の副作用を強く惹起する物質として同定されることから、レポーター活性を増大させない被験物質を選択することにより、浮腫惹起活性のないインスリン抵抗性改善薬をスクリーニングすることができる。

試験用細胞を被験物質の存在下で培養し、PPAR γ の転写誘導能に対するPPAR相互作用FLJ13111の促進作用が被験物質により亢進されることをレポーター遺伝子の発現により検出し測定することができる。①被験物質がPPAR相互作用FLJ13111あるいはPPAR γ に作用し、その作用に依存してPPAR相互作用FLJ13111のPPAR γ 転写誘導活性に対する促進効果の増強を生じるとき、発現するレポーター活性の増大が観察される。このような被験物質は、PPAR γ の主作用促進剤として同定される。また、例えば②被験物質がPPARと結合して転写誘導能を促進し、かつPPAR相互作用FLJ13111による促進効果を増強するとき、発現するレポーター活性の増大が観察される。このような被験物質はPPARの主作用特異的アゴニストとして同定される。また、例えば③被験物質がPPAR相互作用FLJ13111と結合してPPARの転写誘導能促進効果を増強するとき、あるいは被験物質がPPAR相互作用FLJ13111の発現を促進したり分解を抑制するとき、やはり発現するレポーター活性の増大が観察される。このような物質はPPARの主作用を促進するPPAR相互作用FLJ13111活性化剤として同定される。これら①、②及び③はいずれもPPARアゴニストがもたらす副作用と乖離したインスリン抵抗性改善薬として作用することが期待される。より具体的には実施例11、12に記載の方法でインスリン抵抗性改善薬を同定・スクリーニングできる。例えば、実施例12に記載の条件で、ED50が10 μ M以下の物質を、好ましくは1 μ M以下の物質をインスリン抵抗性改善薬として選択することができる。

<PPAR相互作用FLJ13111プロモーターを利用してインスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法>

i) 配列番号26で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド、あるいは配列番

号26で表される塩基配列において、1～10個の塩基が欠失、置換、及び／または挿入されたポリヌクレオチド配列を含みかつ転写プロモーター活性を有するポリヌクレオチドに融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞に被験物質を接触させる工程、及び、ii)レポーター遺伝子の発現を指標として被験物質による転写活性誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴として、インスリン抵抗性改善薬をスクリーニングすることができる。

レポーター遺伝子アッセイ（田村ら、転写因子研究法、羊土社、1993年）は、レポーター遺伝子の発現をマーカーとして遺伝子の発現調節を検出する方法である。一般に遺伝子の発現調節はその5' 上流域に存在するプロモーター領域と呼ばれる部分で制御されており、転写段階での遺伝子発現量はこのプロモーターの活性を測定することで推測することができる。被験物質がプロモーターを活性化すれば、プロモーター領域の下流に配置されたレポーター遺伝子の転写を活性化する。このようにプロモーター活性化作用すなわち発現亢進作用をレポーター遺伝子の発現に置き換えて検出することができる。したがって、PPAR相互作用FLJ13111のプロモーター領域を用いたレポーター遺伝子アッセイにより、PPAR相互作用FLJ13111の発現調節に対する被験物質の作用はレポーター遺伝子の発現に置き換えて検出することができる。配列番号26で表される塩基配列からなるFLJ13111のプロモーター領域と融合された「レポーター遺伝子」は、一般に用いられるものであれば特に限定されないが、定量的測定が容易な酵素遺伝子などが好ましい。例えば、バクテリアトランスポゾン由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子（CAT）、ホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子（Luc）、クラゲ由来の緑色蛍光蛋白質遺伝子（GFP）等があげられる。レポーター遺伝子は、配列番号26で表される塩基配列からなるFLJ13111のプロモーター領域と機能的に融合されていけばよい。PPAR相互作用FLJ13111のプロモーター領域と融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞に被験物質を接触した場合と接触しなかった場合のレポーター遺伝子の発現量を比較することにより被験物質依存的な転写誘導活性の変化を分析することができる。上記工程を実施することにより、FLJ13111の発現を亢進する物質並びにインスリン抵抗性を改善する物質のスクリーニングを実施できる。具体的には、実施例14に記載の方法によ

り、前記スクリーニングを実施できる。

本発明のスクリーニング法で使用する被験物質としては、特に限定されるものではないが、例えば、市販の化合物(ペプチドを含む)、ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物(ペプチドを含む)、コンビナトリアル・ケミストリー技術(N. K. Terrett, M. Gardner, D. W. Gordon, R. J. Kobylecki, J. Steele, Tetrahedron, 51, 8135-73 (1995))によって得られた化合物群、微生物の培養上清、植物や海洋生物由来の天然成分、動物組織抽出物、あるいは、本発明のスクリーニング法により選択された化合物(ペプチドを含む)を化学的又は生物学的に修飾した化合物(ペプチドを含む)を挙げることができる。

<インスリン抵抗性改善用医薬組成物の製造方法>

本発明には、本発明のスクリーニング方法を用いてスクリーニングする工程、及び前記スクリーニングにより得られた物質を用いて製剤化する工程を含むことを特徴とする、インスリン抵抗性改善用医薬組成物の製造方法が包含される。

本発明のスクリーニング方法により得られる物質を有効成分とする製剤は、前記有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる担体、賦形剤、及び/又はその他の添加剤を用いて調製することができる。

投与としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、又は経口用液剤などによる経口投与、あるいは、静注、筋注、若しくは関節注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、又は経粘膜投与剤などによる非経口投与を挙げることができる。特に胃で消化されるペプチドにあつては、静注等の非経口投与が好ましい。

経口投与のための固体組成物においては、1又はそれ以上の活性物質と、少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、又はメタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合することができる。前記組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば、滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、又は溶解若しくは溶解補助剤などを含有することができる。錠剤又は

丸剤は、必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆することができる。

経口のための液体組成物は、例えば、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、又はエリキシル剤を含むことができ、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば、精製水又はエタノールを含むことができる。前記組成物は、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば、湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、又は防腐剤を含有することができる。

非経口のための注射剤としては、無菌の水溶性若しくは非水溶性の溶液剤、懸濁剤、又は乳濁剤を含むことができる。水溶性の溶液剤又は懸濁剤には、希釈剤として、例えば、注射用蒸留水又は生理用食塩水などを含むことができる。非水溶性の溶液剤又は懸濁剤の希釈剤としては、例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油（例えば、オリーブ油）、アルコール類（例えば、エタノール）、又はポリソルベート80等を含むことができる。前記組成物は、更に湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解若しくは溶解補助剤、又は防腐剤などを含むことができる。前記組成物は、例えば、バクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、又は照射によって無菌化することができる。また、無菌の固体組成物を製造し、使用の際に、無菌水又はその他の無菌用注射用媒体に溶解し、使用することもできる。

投与量は、有効成分、すなわち、LTRPC2タンパク質の活性化を阻害する物質、あるいは、本発明のスクリーニング方法により得られる物質の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、又は性別等を考慮して、適宜決定することができる。

例えば、経口投与の場合、その投与量は、通常、成人（体重60kgとして）において、1日につき約0.1～100mg、好ましくは0.1～50mgである。非経口投与の場合、注射剤の形では、1日につき0.01～50mg、好ましくは0.01～10mgである。

実施例

以下、実施例によって本発明を詳述するが、本発明は該実施例によって限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法（「Molecular

Cloning」 Sambrook, Jら、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年、等)に従って実施可能である。また、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って実施可能である。

(実施例1) 主作用リガンド及び副作用リガンドの同定

PPAR γ のアゴニストとして作用することが報告されている5種類のチアゾリジン誘導体、GW7282((S)-3-[4-[2-(5-メチル-2-フェニルオキサゾール-4-イル)エトキシ]フェニル]-2-(1-ピロリル)プロピオン酸; GlaxoSmithKline, Drug Data Rep 2001, 23(9): 889)、GI-262570((S)-2-[(2-ベンゾイルフェニル)アミノ]-3-[4-[2-(5-メチル-2-フェニルオキサゾール-4-イル)エトキシ]フェニル]プロピオン酸; GlaxoSmithKline, W000/38811)、GL-100085(2-(3-(2-(5-メチル-2-フェニルオキサゾール-4-イル)エトキシ)フェニルメチルチオ)酢酸; 小野薬品工業、W099/46232)、ロジグリタゾン(Rosiglitazone、(±)-5-[4-[2-[N-メチル-N-(2-ピリジル)アミノ]エトキシ]ベンジル]-2,4-チアゾリジンジオン マレエート; GlaxoSmithKline, W001/47529)、ピオグリタゾン(pioglitazone、(+)-5-[4-[2-(5-エチル-2-ピリジニル)エトキシ]ベンジル]-2,4-チアゾリジンジオン; 武田薬品工業、特開昭61-267580)の各化合物について作用メカニズムを解明するために、これらをそれぞれの化合物の特許明細書または文献報告の方法に従って合成し、それらの存在下における主作用および副作用を動物個体を用いてそれぞれ測定し、数値化した。なお、主作用の指標として血糖降下作用を、浮腫を惹起する作用の指標として循環血漿量の増加(荒川正昭、最新内科学大系 第三巻 主要症状-症候から診断へ 260-266、1966; 金澤ら、Diabetes Frontier、第10巻、811-818頁、1999年; 岩本、Diabetes Frontier、第10巻、819-824頁、1999年)を測定した。

(1) 化合物群の血糖降下作用の測定

7-8週齢のKKA γ /Taマウス(日本クレア社)に対し、0.5%メチルセルロース(MC)に懸濁後、濃度調製(1-10 mg/kg)した各化合物を1日1回、4日間連続経口投与した。対照群には0.5% MCのみを投与した。最終投与16時間後にマウス尾静脈より採血を行い、血糖値をムタローゼとグルコースオキシダーゼを組み合わせた酵素法(Miwa 1ら Clin Chim Acta 37巻538頁 1972年 参照)を用いた市販キット(グ

ルコースCIIテストワコー、和光純薬工業)により測定した。対照群の血糖値を100%とし、各化合物投与群における結果より、対照群の血糖値を25%低下させると推測される化合物濃度(ED25)を最小自乗法を用いた線形回帰により算出した(表1)。

(2) 化合物群の浮腫惹起活性の測定

ラット(Sprague-Dawley rats; オス、3週齢)に、被験化合物を100 mg/kg (0.5%Methylcelluloseに懸濁)の用量で、一日一回で二週間連続経口投与した。血漿容量の測定は、基本的にJ. Appl. Physiol. 69(6): 2091-2096, 1990に示された方法に従って測定した。エーテル麻酔下で下腿静脈より0.25%エバンスブルー(Evans Blue)溶液(生理食塩水)を0.25ml (0.625mg)／ラットで注入し、5分後、腹部下大静脈より採血した。血漿を水で希釈し、その吸光度(620nm)から得られたエバンスブルー濃度(mg/ml)を注入量(0.625mg)で割った値を血漿容量とした。さらに、血漿容量を体重で補正した値において、対照群(vehicle投与群)に対する量(%)を算出した(表1)。

これらの結果、GW7282は主作用、副作用ともに強く惹起した。一方GI-262570は主作用の惹起は比較的高い値を示すが、副作用は弱い。またGL-100085は主作用の惹起は弱い、副作用を強く惹起した。

【表1】PPAR γ アゴニストの血糖低下作用と循環血漿量増加作用

	血糖降下試験 ED ₂₅ (mg/kg)	循環血漿量 % of CTRL
GW-7282	0.41	130
GI-262570	0.98	124
GL-100085	17	133
ピオグリタゾン	10	110
ロジグリタゾン	4.6	114

(実施例2) PPAR γ とリガンド依存的に相互作用する蛋白質の同定

(1) PPAR γ 遺伝子の単離

PPAR γ のDNA結合領域およびリガンド結合領域を含むC末端側302アミノ酸をコー

ドするcDNAを、ヒト脂肪組織由来のcDNAライブラリー(クロンテック社; Marathon Ready™ cDNA)からポリメラーゼ・チェーン・リアクション法(PCR法)によって取得した。遺伝子データベースGenBankのアクセッション番号U79012に記載されたヒトPPAR γ 2の遺伝子配列を元に、酵母ツーハイブリッド用発現ベクターpDBtrp(インビトロジェン社、選択マーカーとして*TRP*遺伝子を有する)に挿入するため、同ベクターのマルチクローニングサイトの前後40ヌクレオチドとの相同領域を付加し、さらに挿入されたPPAR γ の遺伝子断片の両側にそれぞれ制限酵素Kpn IとSma Iの認識サイトが形成されるように配列番号9及び10に示したプライマーを設計した。PCRはDNAポリメラーゼ(Pyrobest DNA polymerase; 宝酒造社)を用い、98°C(1分)の後、98°C(5秒)/55°C(30秒) 72°C(3分)のサイクルを35回、繰り返した。その結果得られた1004塩基対のDNA断片はPPAR γ 2の第204アミノ酸から終止コドン直前までの302アミノ酸からなるPPAR γ のコード領域を有している。

(2) 酵母ツーハイブリッド用発現プラスミドの作製

制限酵素Sal IおよびNco Iで切断して直鎖上にしたベクターpDBtrp及び(1)で得られたPPAR γ のcDNAを含むPCR断片を同時にツーハイブリッド用酵母株MaV203(インビトロジェン社)へ添加し、リチウム酢酸法により形質転換した(C Guthrie, R Fink Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Academic, San Diego, 1991年)。その結果、同酵母細胞内で相同組換えが生じ、pDBtrpのマルチクローニングサイトにPPAR γ cDNAが挿入されたプラスミド(以下pDB-PPAR γ と略称する)が形成された。同プラスミドを有する酵母細胞を、プラスミドの選択マーカーであるトリプトファンを欠乏させた固形合成最小培地(DIFCO社)(20%アガロース)上にて培養することにより選択し、同酵母細胞をザイモリエース(生化学工業)で室温にて30分間処理した後、アルカリ法(「Molecular Cloning」Sambrook, Jら、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年)でプラスミドを単離精製し、シーケンシングキット(アプライドバイオシステムズ社)およびシーケンサー(ABI 3700 DNA sequencer アプライドバイオシステムズ社)を用いて塩基配列の決定を行い、PPAR γ のcDNAがpDBtrpのGAL4のDNA結合領域のコード領域と翻訳のフレームが一致して挿入されているものを選択した。

(3) 酵母ツーハイブリッドスクリーニング

上述のpDB-PPAR γ により形質転換したツーハイブリッド用酵母株MaV203を400mlのYPD液体培地(DIFCO社)に懸濁し、波長590ナノメートルの吸光度が0.1から0.4になるまで30°Cで約6時間振とう培養した後、リチウム酢酸法でコンピテントセルとし、最終量を1.0mlの0.1M リチウムートリス緩衝液に懸濁した。同細胞をヒト腎臓cDNAライブラリー、ヒト肝臓ライブラリー、またはヒト骨格筋ライブラリー(いずれもクロンテック社Match Maker cDNA library)各20 μ gで形質転換し、同細胞をpDB-PPAR γ およびライブラリーそれぞれのプラスミドの選択マーカであるトリプトファン、ロイシンを欠乏させた固形合成最小培地(DIFCO社)(20%アガロース)上にて培養することにより選別し、両プラスミドが導入された形質転換株を得た。同時に同じ形質転換細胞をトリプトファン、ロイシンのほかに、ツーハイブリッドシステムにおいて人工的に発現させたGAL4 DNA 結合領域の融合蛋白質に、GAL4 転写促進領域の融合蛋白質が結合した場合に発現するレポーター遺伝子 $HIS3$ が作動した細胞を選択するため、ヒスチジンを培地から除き、さらに $HIS3$ がコードする酵素の阻害剤である3AT(3-AMINO-1, 2, 4-TRIAZOLE; シグマ社)20mMを添加した固形最小培地(20%アガロース)上で30°Cで5日間培養した。同培地中には主作用、副作用ともに強く惹起するPPAR γ のアゴニストGW7282を最終濃度1.5 μ M添加しておき、同アゴニストの存在下でPPAR γ に結合する蛋白質を発現していることを示す3AT耐性の酵母のコロニーを取得した。これらの酵母細胞を24時間YPD固形培地上で上述のアゴニストGW7282を15 μ Mの濃度で添加、あるいは非添加の状態で成長させた後、 $HIS3$ とは別のツーハイブリッドシステムの結合指示レポーターである $lacZ$ 遺伝子の発現を β -ガラクトシダーゼ活性を指標として調べた。 β -ガラクトシダーゼ活性は培地上の酵母細胞をニトロセルロースフィルターに移し取り、液体窒素に付けて凍結させた後、室温で解凍し、フィルターを0.4%のX-GAL(シグマ社)溶液を浸した濾紙上にのせて37°Cで24時間静置し、 β -ガラクトシダーゼによる青色変化を測定した。フィルター上に写し取った細胞内容物が白色から青色に変化したコロニーを選択することにより、上述のアゴニストの存在に依存してPPAR γ に結合する蛋白質を発現している酵母細胞を複数特定し、同細胞からクロンテック社Yeast Protocols Handbookの方法に従ってライ

ブラリー由来のプラスミドを抽出した。そこに含まれる遺伝子断片の塩基配列を、配列番号11で表される塩基配列 (GAL4AD領域に結合する配列 ; GenBankアクセッション番号 U29899 Cloning vector pACT2 由来) をプライマーとし、シーケンシングキット (アプライドバイオシステムズ社) およびシーケンサー (ABI 3700 DNA sequencer アプライドバイオシステムズ社) を用いて決定した結果、上述3種類のいずれのライブラリーからも配列番号3に記載のECHLPの部分配列を含むクローンが含まれていることをBLAST (NCBI) によるホモロジー検索により確認した。また腎臓由来ライブラリーからは核内受容体の転写共役因子として知られているSRC-1 (Smith CLらProc. Natl. Acad. Sci. USA., 20巻93 (17) 号8884-8888頁 1996年:), N-CoR (Nagy LらCell, 89巻3号373-380頁1997年) の遺伝子断片を含むクローンが含まれており、上記のスクリーニングでリガンド依存性のPPAR γ の共役因子が取得できることが確認された。

また、同様の酵母ツーハイブリッドスクリーニングを以下の条件のもとで行った。ライブラリーとしてはヒト腎臓cDNAライブラリーで形質転換した細胞を用いた。GW7282は最終濃度1 μ Mとなるように添加し、同アゴニスト存在下でPPAR γ に結合する蛋白質を発現している酵母細胞を24時間YPD固形培地上でGW7282を10 μ Mの濃度で添加した状態で成長させた。 β -ガラクトシダーゼ活性測定により、上述のアゴニストの存在に依存してPPAR γ に結合する蛋白質を発現している酵母細胞を複数特定し、同細胞からライブラリー由来のプラスミドを抽出した。そこに含まれる遺伝子断片の塩基配列を決定した結果、配列番号7に記載のAOP2 (GenBank アクセッション番号 XM_001415) の部分配列を含む独立したクローン2個が含まれていた。また核内受容体の転写共役因子として知られているSRC-1 (Smith CLらProc. Natl. Acad. Sci. USA., 20巻93 (17) 号8884-8888頁 1996年:), N-CoR (Nagy LらCell, 89巻3号373-380頁1997年) の遺伝子断片を含むクローンが含まれており、上記のスクリーニングでリガンド依存性のPPAR γ の転写共役因子を取得できることが確認された。

また、同様の酵母ツーハイブリッドスクリーニングを以下の条件のもとで行った。ライブラリーとしてはヒト肝臓cDNAライブラリーで形質転換した細胞を用いた。GW7282は最終濃度1 μ Mとなるように添加し、同アゴニスト存在下でPPAR γ に結合

する蛋白質を発現している酵母細胞を24時間YPD固形培地上でGW7282を10 μ Mの濃度で添加した状態で成長させた。 β -ガラクトシダーゼ活性測定により、上述のアゴニストの存在に依存してPPAR γ に結合する蛋白質を発現している酵母細胞を複数特定し、同細胞からライブラリー由来のプラスミドを抽出した。そこに含まれる遺伝子断片の塩基配列を決定した結果、配列番号16に記載の新規遺伝子(FLJ13111類似遺伝子 ; GenBank アクセッション番号AK023173の1塩基置換体)の部分配列を含むクローンが含まれていた。

(実施例3) PPAR γ とECHLPまたはAOP2のリガンド選択的相互作用の検出

実施例2で得たECHLP、AOP2をはじめとする蛋白質群とPPAR γ の相互作用に対するアゴニストの依存性を、上述の主作用、副作用に対する効果が異なる2種のアゴニストGI-262570(最終濃度5 μ M、又は0.5 μ M)とGL-100085(最終濃度5 μ M、又は0.5 μ M)を用いて、酵母ツーハイブリッド システムの β -ガラクトシダーゼ活性を指標として測定した(図1 ; 矢尻は黒が主作用選択的な化合物、縞が副作用選択的な化合物の濃度差により相互作用が大きく変化するものをそれぞれ示す。白の矢尻は主・副作用いずれに選択的な化合物でも濃度差による相互作用の変化が大きいものを示す。)。用いたアゴニスト以外の方法の詳細は実施例2と同様である。その結果、主作用に高い効果を持つ化合物GI-262570は、濃度を5 μ Mから0.5 μ Mに減じても同様にPPAR γ とECHLPの結合を誘導したが(図1b)、副作用に比較的高い効果を持つ化合物GL-100085では濃度を5 μ Mから0.5 μ Mに減じるとPPAR γ とECHLPの結合は大きく減退した(図1c)。一方、副作用に比較的高い効果を持つ化合物GL-100085は、濃度を5 μ Mから0.5 μ Mに減じても同様にPPAR γ とAOP2の結合を誘導し(図1c)、主作用に高い効果を持つ化合物GI-262570添加では濃度を5 μ Mから0.5 μ Mに減じるとPPAR γ とAOP2の結合は大きく減弱した(図1b)。これらは、アゴニストGI-262570、GL-100085の存在によってPPAR γ とECHLP、あるいはPPAR γ とAOP2のリガンド依存的相互作用がおこったことによると考えられ、この結果から、ECHLPはPPAR γ と主作用に高い効果を持つアゴニストにより高い感度で相互作用することが明らかとなった。一方AOP2は副作用に高い効果を持つアゴニストにより高い感度で相互作用することが明らかとなった(図1c)。これらの結

果はアゴニストの主作用、副作用に相関してアゴニスト依存的にPPAR γ に相互作用する共役因子があることを示唆している。ECHLPは主作用の強く現れるアゴニストに、より選択的に応答して相互作用しており、このPPAR γ とECHLPのリガンド依存的相互作用を利用することで主作用に高い効果をもつアゴニストを選択的に検出できるものと考えられた。一方クローン#1, 4, 5, 6, 7およびN-CoRはアゴニストGI-262570、GI-100085いずれの濃度減少でもPPAR γ との結合が減弱し、アゴニストの主作用-副作用に相関が見られなかった。

(実施例4) 正常および糖尿病モデルマウスにおけるECHLP発現量の測定

上述の知見に基づき、ECHLPとPPAR γ の相互作用がPPAR γ アゴニストを介した主作用である糖代謝改善に関わることが予想された。そこで2種類の糖尿病モデルマウス KKA γ /Ta (Iwatsuka ら、Endocrinol. Japon.、第17巻、第23-35頁、1970年、Taketomi ら、Horm. Metab. Res.、第7巻、第242-246頁、1975年)、C57BL/KsJ-db/db (Chen ら、Cell、第84巻、第491-495頁、1996年、Lee ら、Nature、第379巻、第632-635頁、1996年、Kaku ら、Diabetologia、第32巻、第636-643頁、1989年)の骨格筋、脂肪におけるECHLP遺伝子のマウスオルソログ ech1 遺伝子のメッセンジャーRNA (mRNA) 発現量をDNAアレイ(アフィメトリクス社)を用いて測定し(de Saizieu ら、Nature Biotechnology、第16巻、第45-48頁、1998年、Wodicka ら、Nature Biotechnology、第15巻、第1359-1367頁、1997年、Lockhart ら、Nature Biotechnology、第14巻、第1675-1680頁、1996年)、正常個体 C57BL/6J、C57BL/KsJ- \rightarrow m/ \rightarrow m のそれと比較することにした。

(1) マウスの組織の摘出： 日本クレア社よりオスの C57BL/6J、KKA γ /Ta、C57BL/KsJ- \rightarrow m/ \rightarrow m 及び C57BL/KsJ-db/db マウスを各8匹購入した。C57BL/6Jは普通食で15週齢になるまで集団飼育した。KKA γ /Ta マウスは高カロリー食(CMF, Oriental Yeast Co., Ltd.)で15週齢になるまで単独飼育した。C57BL/KsJ- \rightarrow m/ \rightarrow m マウス及び C57BL/KsJ-db/db マウスは普通食で12週齢になるまで集団飼育した。KKA γ /Ta マウスおよび C57BL/KsJ-db/db マウスが正常マウスと比較して高血糖、高体重になっていることを確認した(KKA γ /Ta マウス：血糖値 514.2 ± 18.2 mg/dl、体重 49.9 ± 0.7 g、C57BL/KsJ-db/db マウス：血糖値 423.7 ± 14.1 mg/dl、体重

48.6±0.5 g)。血糖値はマウス尾静脈より採血を行い、血糖値をグルコースオキシダーゼ法を用いた市販キット(オートパック A・グルコース試薬、ベーリンガー・マンハイム社)により測定した。これらの 4 種類のマウスをジエチルエーテルで麻酔し、副睾丸脂肪とひふく筋を摘出した。摘出直後に液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。

(2)mRNA の抽出：組織は凍結プレス破碎装置 CRYO-PRESS CP-100(マイクロテック・ニチオン社)を用いて破碎した。RNA 抽出用試薬 ISOGEN (ニッポンジーン社)を加え、ホモジナイザーULTRA-TURRAX T-8 (IKA LABORTECHNIK 社)を用いてホモジネートした。メーカー添付のプロトコールに従い、これらのサンプルから RNA を抽出した。これを DNase (ニッポンジーン社)で処理し、混入している DNA を分解した。その後、フェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿を行い、RNase-free H₂O に溶解した。RNA 調製試薬 QuickPrep Micro mRNA Purification kit (アマシャム社)を用いて添付プロトコールに従い mRNA を抽出した。

(3)ラベル化 cRNA の調製：アフィメトリクス社のプロトコール(GeneChip Expression Analysis Technical Manual)に従って、mRNA から第 1 ストランド cDNA 合成、第 2 ストランド cDNA 合成、ビオチンラベル化 cRNA の合成、ラベル化 cRNA のフラグメント化を行った。

(4)ハイブリダイゼーション：アフィメトリクス社の DNA アレイ(GeneChip U74)は 3 枚のサブアレイ A、B、C からなっている。アフィメトリクス社の上記プロトコールに従って、DNA アレイにラベル化 cRNA をハイブリダイズした後、洗浄し、各プローブの蛍光強度を測定した。

(5)アレイ間の測定値の補正：測定値については、サンプル間の補正を行った後、サブアレイ間の補正を行った。サンプル間の補正は、特定のサブアレイ上の遺伝子の蛍光強度の合計値をサンプル間で求め、最も高い蛍光強度の合計値を示したアレイと等しくなるようにその他のアレイの各遺伝子の測定値にアレイごとに一定の倍率をかけた。サブアレイ間の補正は、サブアレイごとに AFFX プローブの蛍光強度の平均値を求め、サブアレイ A、B、C でそれらの平均値が同じになるようにサブアレイごとに各遺伝子の測定値に一定の倍率をかけた。

その結果 KKA^y/Ta マウスでは、発症が進行していない5週齢の個体、あるいは正常個体と比較して病態発症が顕著な15週齢の個体では ech1 mRNA の発現量が2倍以上に増大していることが確認された(図2)。同様に db/db マウスでも正常個体と比較して ech1 発現量が2倍以上に増大していた。また15週齢の KKA^y/Ta マウスにおける ech1 発現量の亢進は腎尿細管糖輸送における再吸収阻害剤として知られるフロリジン(phlorizin)を100 mg/kgの用量で30分おきに3回、腹腔内投与し、血糖値が短期的に正常レベルになった最初の投与から7時間後の組織でも変化がないことから、ech1 は、糖尿病態の結果としておこる血糖値の変動に起因して発現が亢進しているのではなく、その発現の亢進が糖尿病態を惹起する原因因子の一つであると考えられた。

上述と同じDNAアレイを用いて12週齢、オスの正常マウスC57BL/6J個体の臓器毎にech1のmRNA発現量を測定した結果、ech1は主要臓器のうちPPAR γ の作用がある脂肪、筋肉、肝臓、腎臓と、ほかに心臓、肺での発現が顕著であった(図3)。これにより発現部位からもECHLP/Ech1がPPAR γ の共役因子であることが裏付けられた。

(実施例5) PPAR γ のリガンド依存的転写誘導能に対するECHLPの調節作用の検出

上述の結果から、ECHLPはPPAR γ とリガンドを介して相互作用し、主作用(糖代謝改善)に関わること、さらにその発現亢進が糖尿病の病態と関連することが示された。そこでECHLPがPPAR γ の有する転写誘導活性にどのような影響を及ぼすか、培養細胞COS-1を用いたレポーターアッセイで調査した。

(1) 動物細胞発現用プラスミドGAL-PPAR γ の作製

ヒトPPAR γ 2のリガンド結合領域をコードするcDNAを酵母Gal4のDNA結合領域(1-147アミノ酸)のC末端側に融合したキメラ蛋白質をコードする遺伝子を動物細胞発現ベクターpZeoSV(インビトロジェン社)のマルチクローニングサイトに組み込んだ発現プラスミドGAL-PPAR γ を作製した。まずプラスミドpGBT9(クロンテック社)からGal4のDNA結合領域をコードする遺伝子断片を制限酵素Hind III、Sma Iを用いて切り出し、これをpZeoSVのマルチクローニングサイトのサイトに挿入した(以下pZeo-DBと略記する)。次に前述のプラスミドpDB-PPAR γ からPPAR γ のリガンド結合領域をコードするDNA断片をKpn I、Sma Iを用いて切り出し、これを

pZeo-DBのマルチクローニングサイトにあるKpnI、Pvu IIサイトの間に組み込み、動物細胞発現用プラスミドGAL-PPAR γ を作製した。

(2) 動物細胞発現用プラスミドpcDNA-ECHLPの作製

配列番号12及び13に示したプライマーを用いて、ヒト骨格筋cDNAライブラリー(クロンテック社)からPCR法によりECHLPの全長域をコードする987bp(ベースペア)を含むcDNA断片を取得した。PCRはDNAポリメラーゼ(Pyrobest DNA polymerase; 宝酒造社)を用い、98°C(1分)の後、98°C(5秒)/55°C(30秒) 72°C(3分)のサイクルを35回、繰り返した。これをpcDNA3.1/V5-HIS-TOPOベクター(インビトロジェン社)に*in vitro*組換えによるTOPOクローニング法(インビトロジェン社)により挿入して動物細胞発現用プラスミドpcDNA-ECHLPを作製した。なおECHLPには終止コドン挿入せず、C末端側にベクター由来のV5エピトープおよびHIS6タグが融合されるようにプライマーを設計した。

(3) PPAR γ のリガンド依存的転写誘導能に対するECHLPの調節作用の検出

培養細胞COS-1細胞は6ウェル培養プレート(ウェル直径35mm)の培養皿に各ウェル2mlの10%牛胎児血清(シグマ社)を含む最少必須培地DMEM(ギブコ社)を加えて70%コンフルエントの状態になるまで培養した。この細胞にリン酸カルシウム法(Graham Lら Virology、52巻456頁1973年、新井直子、遺伝子導入と発現/解析法13-15頁1994年)により、上述のGAL-PPAR γ (0.15 μ g/ウェル)、およびGAL4結合配列を8個繰り返シルシフェラーゼ遺伝子上流に配置したレポーターコンストラクト(RE \times 8-Luci、; 下川ら、国際公開番号W099/04815) (0.8 μ g/ウェル)をpcDNA-ECHLP (0.05-0.2 μ g/ウェル)とともに一過性にコトランスフェクトした。PPAR γ アゴニスト2 μ Mあるいは被験化合物を培地に添加して48時間培養した後、培地を除去し、細胞をリン酸緩衝液(以下PBSと略称する)で洗浄した後にウェルあたり0.4 mlの細胞溶解液(100mM リン酸カリウム(pH7.8)、0.2%トリトンX-100)を添加して細胞を溶解した。この細胞溶解液100 μ lにルシフェラーゼ基質溶液100 μ l(ピッカジーン社)を添加し、AB-2100型 化学発光測定装置(アトー社)を用いて10秒間の発光量を測定した。ルシフェラーゼレポーター遺伝子と同時に β -ガラクトシダーゼ発現遺伝子をもつプラスミドpCH110(アマシャムファルマシアバイオテック社)0.4 μ g/ウェルを細胞にコトランスフェクトし、 β -ガラクト

シダーゼ活性検出キットGalacto-Light Plus™system(アプライドバイオシステムズ社)を用いて β -ガラクトシダーゼ活性を測定し数値化した。これを導入遺伝子のトランスフェクション効率として上述のルシフェラーゼ活性を各ウェル毎に補正した。

上記実験の結果、PPAR γ のアゴニスト依存的な転写誘導活性は、細胞にトランスフェクトしたECHLP発現プラスミドの用量に依存して著しい阻害が認められた(図4)。これによりPPAR γ とECHLPのリガンド依存的な相互作用がおこると、PPAR γ の転写誘導活性が抑制されることが明らかになった。この事実は、前述の糖尿病モデルマウスにおいて、過剰なECHLP/Ech1が病態の原因因子であることを示した結果とよく一致する。すなわち、糖尿病の病態ではECHLP/Ech1の過剰発現が生じたことによってPPAR γ 転写誘導活性の抑制が起こり、その結果PPAR γ によって誘導されるべき下流遺伝子の発現が十分でないために糖代謝が阻害されると考えられた。

ECHLP/Ech1は分子内に脂肪酸代謝に働くエノイルCoA加水酵素(enoyl-CoA hydratase)とジエノイルCoA異性化酵素(dienoyl-CoA isomerase)の2種類の酵素活性領域と予想される構造を有する(Filppula AらJ. Biol. Chem., 273巻1号:349-355頁1998年)。また脂肪酸代謝酵素の阻害剤は糖尿病態マウスにおいて血糖値を降下させることが以前から知られていた(Collier RらHorm. Metab. Res., 25巻1号:9-12頁1993年)。この事実と、ECHLPがPPAR γ 活性の抑制作用をもつという上述の知見から、ECHLPは過剰に存在するとPPAR γ を介する糖代謝を抑えて自らの脂肪酸代謝酵素活性により脂質からのエネルギー生成を促進し、減少するとPPAR γ 活性を解除して糖代謝へ生体のエネルギー源をシフトさせる、糖・脂肪代謝の拮抗的な調節を担う分子であると考えられた。これを利用して、PPAR相互作用ECHLPの量を減じれば、あるいは相互作用ECHLPによるPPAR γ に対する抑制作用を阻害すれば、生体のエネルギー源を糖代謝へ向かわせ血糖値を降下させることが可能である。同時にECHLPを用い、そのような作用を持つ化合物を容易に選択することが可能である。

(実施例6) 正常および糖尿病モデルマウスにおけるAOP2蛋白量の比較

上述の知見に基づき、AOP2とPPAR γ の相互作用がPPAR γ アゴニストを介した副作用である浮腫の惹起に関わることが予想された。そこで糖尿病モデルマウス KKA γ /Ta(Iwatsukaら、Endocrinol. Japon.、第17巻、第23-35頁、1970年、Taketomiら、Horm. Metab. Res.、第7巻、第242-246頁、1975年)と正常個体 C57BL/6Jの脂肪に含まれる蛋白質含量を蛍光標識2次元ディファレンス電気泳動法(Onliら、Electrophoresis 第18巻、第2071-2077頁、1997年、Tongeら、Proteomics、第1巻、第377-396頁、2001年)を用いて比較した。病態モデルマウスにおいて蛋白質含量に2倍以上の差異が認められる蛋白質群について、質量分析法を用いて各蛋白質を同定した。

(1) マウスの組織の摘出

日本クレアよりオスのC57BL/6J、KKA γ /Taマウスを購入した。C57BL/6Jは普通食で12週齢になるまで集団飼育した。KKA γ /Taマウスは高カロリー食(CMF、オリエンタルイースト社)で12週齢になるまで単独飼育した。KKA γ /Taマウスが正常マウスと比較して高血糖、高体重になっていることを確認した(KKA γ /Taマウス：血糖値 514.2 ± 18.2 mg/dl、体重 49.9 ± 0.7 g)後、これら2種類のマウスをジエチルエーテルで麻酔し、副睾丸脂肪を摘出した。摘出直後に液体窒素で凍結し、 -80°C で保存した。

(2) 蛋白質試料の調製

凍結した副睾丸脂肪をウレア、両性界面活性剤を含むトリス緩衝液中でホモジナイザーULTRA-TURRAX T-8 (IKA LABORTECHNIK社)を用いてホモジネートした。メーカー添付のプロトコールに従い、これらのサンプルから遠心分離操作により上清を得て以下の二次元電気泳動用の試料とした。

(3) 2次元電気泳動

アマシャムファルマシアバイオテクのプロトコールに従った。それぞれの試料に対して吸光度を測定することにより含有蛋白質量を決定し、それらから約 $50 \mu\text{g}$ の蛋白質を含む量を取り、それぞれ異なる蛍光色素(Cy3およびCy5、アマシャムファルマシアバイオテク社)による標識を行った後に混合し、IPGストリップ(アマシャムファルマシアバイオテク社)を用いて一次元目の等電点電気泳動を行った。二次元目の電気泳動の前に、IPGストリップをウレア、ドデシル硫酸ナトリ

ウム、グリセロール、ジチオスレイトールを含むトリス緩衝液で平衡化し、さらにヨードアセトアミドを溶解したウレア、ドデシル硫酸ナトリウム、グリセロール、ジチオスレイトールを含むトリス緩衝液で平衡化した。二次元目の電気泳動はドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド電気泳動を用いて行った。二次元電気泳動が終了したゲルを蛍光イメージ解析装置(アマシャムファルマシアバイオテク社)を用いて、それぞれの蛍光色素に特異的な励起・検出波長を使用して、それぞれの二次元電気泳動像を得た。それら二つの泳動像を解析ソフトウェア(アマシャムファルマシアバイオテク社)を用いて定量化し、病態モデル動物において蛋白質含量に2倍以上の差異が認められるスポットを特定し、スポットピッキング装置(アマシャムファルマシアバイオテク社)により切り出し、トリプシンを用いてゲル内酵素消化法(Schevchenkoら、Analytical Chemistry、第68巻、第850-858頁、1996年)によりタンパク質を断片化し、ペプチド混合物をゲルより回収した。

(4) マススペクトル法による蛋白質の同定

得られたペプチド混合物をキャピラリー逆相液体クロマトグラフィーカラム(直径0.075mm、長さ150mm、エルシーパッキング社)を用い、0.2%ギ酸存在下、流速を毎分約200nLに設定し、アセトニトリル勾配溶出法にて各ペプチドを分離した。液体クロマトグラフ装置(マイクローム・バイオリソース社)に直接接続したエレクトロスプレーイオン源を有する四重極イオントラップ型質量分析装置(サーモクエスト社)により、自動的に各ペプチドの分子イオンを選択しそのプロダクトイオンスペクトルを測定する方法を用いて各ペプチドのプロダクトイオンスペクトルを得た。

KKAY/Taマウスの副睾丸脂肪において正常個体と比較して2倍の含量増加を確認した蛋白質の断片ペプチドの個々のプロダクトイオンスペクトルを、公共の蛋白質データベースMSDB(リリース20010401)を用い、解析ソフトMascot(マトリクスサイエンス社)にて検索照合した結果、マウスAOP2蛋白質(AOP2/ 1-Cys Prx/nonselenium glutathione peroxidase; GenBank accession 番号AF004670、AF093852、Y12883)中の4カ所の部分アミノ酸配列が一致し、マウスAOP2蛋白質であることが判明した。これにより糖尿病態においてはAOP2蛋白質含量が増加する

ことが明らかとなった。

(実施例7) 組織によるAOP2発現量の比較

配列番号14及び15に示したプライマーを用いて、ヒトcDNAライブラリー(クロンテック社)からPCR法(DNAポリメラーゼ(Pyrobest DNA polymerase; 宝酒造社)を用い、98°C(1分)の後、98°C(5秒)/55°C(30秒) 72°C(3分)のサイクルを35回繰り返した)によりAOP2をコードする673bp(ベースペア)のcDNA断片の増幅をアガロースゲル電気泳動法により検出した。その結果、AOP2は主要臓器のうちPPAR γ の作用がある脂肪、筋肉、肝臓、腎臓と、ほかに心臓での発現が顕著であった。これにより発現部位からもAOP2がPPAR γ の転写共役因子であることが裏付けられた。

(実施例8) PPAR γ のリガンド依存的転写誘導能に対するAOP2の調節作用の検出

上述の結果から、AOP2はPPAR γ とリガンドを介して相互作用し、浮腫の惹起に関わること、さらにその発現亢進が糖尿病の病態と関連することが示された。そこでAOP2がPPAR γ の有する転写誘導活性にどのような影響を及ぼすか、培養細胞COS-1を用いたレポーターアッセイで調査した。

(1) 動物細胞発現用プラスミドpcDNA-AOP2の作製

配列番号14及び15に示したプライマーを用いて、ヒト腎臓cDNAライブラリー(クロンテック社)からPCR法(DNAポリメラーゼ(Pyrobest DNA polymerase; 宝酒造社)を用い、98°C(1分)の後、98°C(5秒)/55°C(30秒) 72°C(3分)のサイクルを35回繰り返した)によりAOP2の全長域をコードする673bpを含むcDNA断片を取得した。これをpCDNA3.1/V5-His-TOPOベクター(インビトロジェン社)にin vitro 組換えによるTOPOクローニング法(インビトロジェン社)により挿入して動物細胞発現用プラスミドpcDNA-AOP2を作製した。なおAOP2には終止コドン挿入せず、C末端側にベクター由来のV5epitopeおよびHis6タグが融合されるようにプライマーを設計した。

(2) PPAR γ のリガンド依存的転写誘導能に対するAOP2の調節作用の検出

培養細胞COS-1細胞は6ウェル培養プレート(ウェル直径35mm)の培養皿に各ウェル2mlの10%牛胎児血清(シグマ社)を含む最少必須培地DMEM(ギブコ社)を加えて

70%コンフルエントの状態になるまで培養した。この細胞にリン酸カルシウム法 (Graham Lら Virology、52巻456頁1973年、新井直子、遺伝子導入と発現／解析法13-15頁1994年)により、実施例5(1)により作製したGAL-PPAR γ (0.15 μ g/ウェル)、およびGAL4結合配列を8個繰り返しルシフェラーゼ遺伝子上流に配置したレポーターコンストラクト(RE \times 8-Luci, ; 下川ら、国際公開番号 W099/04815) (0.8 μ g/ウェル)をpcDNA-AOP2 (0.05-0.2 μ g/ウェル)とともに一過性にコトランスフェクトした。PPAR γ アゴニストGW7282を2mM あるいは被験化合物を培地に添加して48時間培養した後、培地を除去し、細胞をリン酸緩衝液(以下PBSと略称する)で洗浄した後にウェルあたり0.4 mlの細胞溶解液(100mM リン酸カリウム(pH7.8)、0.2%トリトンX-100)を添加して細胞を溶解した。この細胞溶解液100 μ lにルシフェラーゼ基質溶液100 μ l(ピッカジーン社)を添加し、AB-2100型 化学発光測定装置(アトー社)を用いて10秒間の発光量を測定した。ルシフェラーゼレポーター遺伝子と同時に β -ガラクトシダーゼ発現遺伝子をもつプラスミドpCH110(アマシャムファルマシアバイオテク社)0.4 μ g/ウェルを細胞にコトランスフェクトし、 β -ガラクトシダーゼ活性検出キットGalacto-Light PlusTMsystem(アプライドバイオシステムズ社)を用いて β -ガラクトシダーゼ活性を測定し数値化した。これを導入遺伝子のトランスフェクション効率として上述のルシフェラーゼ活性を各ウェル毎に補正した。

上記実験の結果、PPAR γ のアゴニスト依存的な転写誘導活性は、細胞にトランスフェクトしたAOP2発現プラスミドの用量に依存した促進が認められた(図5)。これにより、PPAR γ とAOP2のアゴニスト依存的な相互作用が起こるとPPAR γ の転写誘導活性が亢進することが明らかになった。

この事実と、腎臓を含む組織でAOP2の発現があり、糖尿病モデルマウスにおいてAOP2蛋白量が病態で亢進している前述の結果から、糖尿病の病態では細胞中のAOP2存在量が亢進し、それに伴う腎臓など特定組織での過剰なPPAR γ 活性の促進が副作用(浮腫)をもたらすと考えられた。

AOP2はアミノ酸配列の相同性から分子内にペルオキシダーゼ様配列を持つことから抗オキシダント蛋白質2(anti-oxidant protein 2、(GenBank アクセッション番号XM_001415))と呼称されているが、実際の生理活性としてはカルシウム非依

存性のフォスホリパーゼA2として機能する報告があり(acidic calcium-independent phospholipase A2; Kim TSら、J. Biol. Chem., 272巻16号10981頁1997年)、またマウスでは同Aop2蛋白質の遺伝子座が多嚢胞性腎症の原因遺伝子として報告されている(LTW4/Aop2; lakoubova OA, ら Genomics 42巻3号 474-478頁1997年)。このようにAOP2はそのアミノ酸配列構造から予想される分子機能とは異なる作用を持つことが明らかであり、その本来の生理機能は確定されていない。AOP2がPPAR γ とリガンド依存的に結合し、その転写共役因子として機能するという本発明者による発見は、該分子の機能における新規の知見である。このAOP2を利用することにより、PPAR γ の作動薬から浮腫を惹起するものを発見し除去することが可能である。

(実施例9) PPAR γ を介した主作用を選択的に亢進する化合物のスクリーニング系

以上の知見から、実施例5におけるレポーターアッセイ系で検出可能なECHLPとPPAR γ の相互作用、およびECHLPによるPPAR γ のリガンド依存転写促進能の抑制は、これを阻害する化合物をスクリーニングすることによって糖代謝を改善し、糖尿病態の回復に寄与する新規の糖尿病治療薬のスクリーニングが可能である。さらにそこで得られる被験物質の中から、実施例8におけるレポーターアッセイ系で検出できるAOP2とPPAR γ の相互作用、およびAOP2によるPPAR γ のリガンド依存転写促進能の亢進を引き起こさない物質をスクリーニングすることにより、副作用である浮腫を引き起こさずに糖尿病態の回復に寄与する糖尿病治療薬のスクリーニングが可能である。

すなわち実施例5、8と全く同様のレポーター活性測定系で被験化合物をスクリーニングできるが、より大量の被験化合物を効率よくスクリーニングするために下記のレポーターアッセイ系を構築した。

方法の詳細は前述の実施例5に示したものと同一とし、PPARアゴニストの存在によりECHLPによるPPAR γ の転写活性化能抑制が認められる条件下において、過剰量の被験化合物を並存させ競合させることで該転写活性化能抑制作用を阻害する化合物をスクリーニングした。具体的には6ウェル培養プレートに培養細胞COS-1細胞を10%牛胎児血清を含む最少必須培地DMEM中で70%コンフルエントの状態に

なるまで培養した。同細胞にリン酸カルシウム法でGAL-PPAR γ (0.15 μ g/ウェル)、およびRE \times 8-Luci (0.8 μ g/ウェル)を、pcDNA-ECHLP (0.15 μ g/ウェル)とともにコトランスフェクトした。ここへPPAR γ アゴニストとして最終濃度0.1 μ MのGW7282を添加した条件下で、被験化合物 (10–1.0 μ M) をさらに培地に添加して並存させるかたちで48時間培養した後、細胞をPBSで洗浄した後にウェルあたり0.4mlの細胞溶解液を添加して溶解した。同液100 μ lを96ウェルプレートに移して前述実施例5の方法に従いルシフェラーゼ活性および β -ガラクトシダーゼ活性を測定してPPAR γ の活性化を数値化した。PPAR γ アゴニストとして添加した低濃度のGW7282 (0.1 μ M) が存在する条件下で認められるECHLPの発現によるリガンド依存的なPPAR γ の転写誘導能抑制 (補正したルシフェラーゼ活性値の比) を基準とし、そこへ過剰の被験化合物10あるいは1.0 μ Mを加えた条件で前記転写誘導能抑制を阻害する化合物をスクリーニングした。このECHLPによるPPAR γ 転写誘導能抑制を阻害する物質をスクリーニングする基準は、阻害活性強度 (IC₅₀) において、好ましくは10 μ M以下、さらに好ましくは1.0 μ M以下である。本スクリーニング系により、先に記載した化合物GI-262570は、10 μ MでECHLPによるリガンド (0.1 μ M GW7282) 依存的なPPAR γ 転写誘導能抑制を一部阻害した (図6a)。一方化合物GL-100085は、10 μ Mでも同転写誘導能抑制を阻害せず、GI-262570はPPAR γ の主作用に特異性が高く、GL-100085の同主作用が低い化合物として実際に選択することができた。

続いてさらに同スクリーニング系で選択した各被験化合物 (10–1.0 μ M) をここでは単独で、同スクリーニング系のpcDNA-ECHLPをpcDNA-AOP2 (0.15 μ g/ウェル) に置き換えて構築したスクリーニング系に添加し、AOP2によるPPAR γ の転写誘導能に対する被験化合物依存的な促進が存在するか上述と同様に補正したルシフェラーゼ活性を測定することにより検定した。このスクリーニング系により、上述の化合物GW7282およびGL-100085は、1.0–10 μ Mでその存在依存的にAOP2の共存下でPPAR γ の転写誘導能を約4–5倍あるいは4–6倍に促進することを確認した。一方で化合物GI-262570は1.0 μ M、10 μ Mいずれにおいても同転写誘導能を3.5倍程度にしか促進しなかった (図6B)。これにより、本スクリーニング系を用いてPPAR γ の副作用に特に特異性が高い化合物としてGL-100085を、また副作用惹起に比較的

特異性の低い化合物としてGI-262570を、実際に選択することが可能であった。

(実施例10) 組織によるFLJ13111の発現量の比較

配列番号18及び配列番号19に示したプライマーを用いて、ヒトcDNAライブラリー(クロンテック社)からPCR法(DNAポリメラーゼ(Pyrobest DNA polymerase; 宝酒造社)を用い、98°C(1分)の後、98°C(5秒)/55°C(30秒) 72°C(3分)のサイクルを35回繰り返した)によりFLJ13111をコードするcDNA断片の増幅をアガロースゲル電気泳動法により検出した。その結果、FLJ13111は主要臓器のうちPPAR γ の作用がある筋肉、肝臓のほか、乳腺、肺、胎盤、卵巣、リンパ球、白血球での発現が顕著であったが、PPAR γ リガンドの浮腫の惹起にかかわる腎臓では殆ど発現が見られなかった。これにより発現部位からFLJ13111はPPAR γ の転写共役因子であることが裏付けられた。

(実施例11) PPAR γ のリガンド依存的転写誘導能に対するFLJ13111の調節作用の検出

上述の酵母ツーハイブリッド解析の結果から、FLJ13111はPPAR γ とリガンドを介して相互作用することが示された。そこでFLJ13111がPPAR γ の有する転写誘導活性にどのような影響を及ぼすか、培養細胞COS-1を用いたレポーターアッセイで調査した。

(1) 動物細胞発現用プラスミドpcDNA-FLJ13111の作製

配列番号18及び配列番号19に示したプライマーを用いて、ヒト肝臓cDNAライブラリー(クロンテック社)からPCR法(DNAポリメラーゼ(Pyrobest DNA polymerase; 宝酒造社)を用い、98°C(1分)の後、98°C(5秒)/55°C(30秒) 72°C(3分)のサイクルを35回繰り返した)により配列番号16に示すFLJ13111をコードする897bpを含むcDNA断片を取得した。これをpCDNA3.1/V5-His-TOPOベクター(インビトロジェン社)にin vitro 組換えによるTOPOクローニング法(インビトロジェン社)により挿入して動物細胞発現用プラスミドpcDNA-FLJ13111を作製した。なおFLJ13111には終止コドン挿入せず、C末端がわにベクター由来のV5epitopeおよびHis6タグが融合されるようにプライマーを設計した。

(2) PPAR γ のリガンド依存的転写誘導能に対するFLJ13111の調節作用の検出

上述実施例5(3)と同様の方法でpcDNA-ECHLPをpcDNA-FLJ13111に置き換えるこ

とにより、PPAR γ のリガンド依存的転写誘導能に対するFLJ13111の作用をレポーターアッセイで測定する系を作製した。また、PPAR γ アゴニストとしてはロジグリタゾン1mMを用いた。ロジグリタゾンを添加してルシフェラーゼ活性を測定した結果、PPAR γ のアゴニスト依存的な転写誘導活性は、細胞にトランスフェクトしたFLJ13111発現プラスミドの用量に依存した促進が認められた(図7)。これにより、PPAR γ とFLJ13111のアゴニスト依存的な相互作用が起こるとPPAR γ の転写誘導活性が亢進することが明らかになった。

この事実と、PPAR γ リガンドの浮腫の惹起にかかわる腎臓でFLJ13111の発現が殆ど無いことから、FLJ13111によるPPAR γ 活性の促進は、副作用でなく主作用を増強すると考えられた。

FLJ13111は機能未知の蛋白質であり、アミノ酸配列から分子内に細胞核内の存在を示唆する核標的配列(Nuclear Targeting Sequence)やグリコシル化を受けうる部位(N-glycosylation site)の存在が予想される他は、アミノ酸配列構造から分子機能を示唆する情報はなかった。FLJ13111がPPAR γ とリガンド依存的に結合し、その転写共役因子として機能するという本発明者による発見は、該分子の機能における新規の知見である。このFLJ13111を利用することにより、PPAR γ の主作用選択的な作動薬を発見することが可能である。

(実施例12) PPAR γ を介したFLJ13111のリガンド選択的作用の検出、およびPPAR γ を介した主作用を選択的に亢進する化合物のスクリーニング系

以上の知見から、実施例11におけるレポーターアッセイ系で検出可能なFLJ13111によるPPAR γ のリガンド依存転写促進能の亢進作用を促進する化合物をスクリーニングすることによって糖代謝を改善し、糖尿病態の回復に寄与する新規の糖尿病治療薬のスクリーニングが可能である。またさらにそこで得られる被験物質の中から、実施例8におけるレポーターアッセイ系で検出できるA0P2とPPAR γ の相互作用、およびA0P2によるPPAR γ のリガンド依存転写促進能の亢進を阻害する物質をスクリーニングすることにより、副作用である浮腫を引き起こさずに糖尿病態の回復に寄与する糖尿病治療薬のスクリーニングが可能である。

すなわち実施例11と全く同様のレポーター活性測定系で被験化合物をスクリー

ニングできるが、大量の被験化合物を効率よくスクリーニングするために下記の条件に設定しレポーターアッセイを実施した。GAL-PPAR γ (0.15 μ g/ウェル)、レポーターコンストラクト(RE \times 8-Luci ; 0.8 μ g/ウェル)および β -ガラクトシダーゼ発現遺伝子をもつプラスミドpCHI10 (0.4 μ g/ウェル)をpcDNA-FLJ13111 (0.1 μ g/ウェル)とともにCOS-1細胞に一過性にコトランスフェクトした。ここへ最終濃度10–0.1 μ Mの被験化合物を培地に添加して48時間培養した後、ルシフェラーゼ活性および β -ガラクトシダーゼ活性を測定してPPAR γ の活性化を数値化した。上記条件以外のトランスフェクション方法およびルシフェラーゼ測定方法の詳細は実施例5及び実施例9に従った。被験化合物の添加、非添加の各条件下でFLJ13111の発現によるPPAR γ の転写誘導能促進(補正したルシフェラーゼ活性値の比)を指標にスクリーニングした。このFLJ13111によるPPAR γ 転写誘導能を促進する物質をスクリーニングする基準は、有効濃度(ED50)において、好ましくは10 μ M以下、さらに好ましくは1.0 μ M以下とした。本スクリーニング系により、ロジグリタゾンおよびピオグリタゾンは、1 μ MでFLJ13111によるPPAR γ 転写誘導能を促進した。一方化合物GL-100085は、10 μ Mでも同転写誘導能を促進せず、ロジグリタゾン、ピオグリタゾンはPPAR γ の主作用に特異性が高く、GL-100085は同主作用が低い化合物として実際に選択することが可能であった。

(実施例13) 正常マウスおよび糖尿病モデルマウスにおけるFLJ13111発現量の測定

上述の知見によりFLJ13111蛋白質とPPAR γ の相互作用がPPAR γ アゴニストを介した主作用である糖代謝改善に関わることが予想された。そこで前述実施例4に記載の2種類の糖尿病モデルマウス、KKA y /Ta および C57BL/KsJ-db/db の筋肉におけるFLJ13111遺伝子のマウスオルソログ遺伝子のメッセンジャーRNA(mRNA)発現量を測定し、正常個体C57BL/6J、C57BL/KsJ- $^{tm}/^{tm}$ のそれと比較することにした。遺伝子発現量は、本発明のFLJ13111遺伝子の発現量を測定し、同時に測定したグリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH))遺伝子の発現量により補正した。測定系としてはPRISMTM 7700 Sequence Detection SystemとSYBR Green PCR Master Mix (アプライドバ

イオシステムズ社)を用いた。本測定系においては PCR で増幅された 2 本鎖 DNA がとりこむ SYBR Green I 色素の蛍光量をリアルタイムに検出及び定量することにより、目的とする遺伝子の発現量が決定される。

具体的には、以下の手順により測定した。

(1) マウスの組織の摘出および mRNA の抽出

前述実施例 4 と同一の方法により調製した。

(2) 1 本鎖 cDNA の合成

全 RNA から 1 本鎖 cDNA への逆転写は、(1)で調製した $1\mu\text{g}$ の RNA (15 あるいは 12 週齢のマウスの筋肉) をそれぞれ用い、逆転写反应用キット (Advantage™ RT-for-PCR Kit ; クロンテック社) を用いて $20\mu\text{l}$ の系で行った。逆転写後、滅菌水 $180\mu\text{l}$ を加えて -20°C で保存した。

(3) PCR プライマーの作製

4 つのオリゴヌクレオチド (配列番号 20-24) を (4) の項で述べる PCR のプライマーとして設計した。FLJ13111 遺伝子に対しては配列番号 20 と配列番号 21 の組み合わせ、G3PDH 遺伝子に対しては配列番号 22 と配列番号 23 の組み合わせで使用した。

(4) 遺伝子発現量の測定

PRISM™ 7700 Sequence Detection System による PCR 増幅のリアルタイム測定は $25\mu\text{l}$ の系で説明書に従って行った。各系において 1 本鎖 cDNA は $5\mu\text{l}$ 、2xSYBR Green 試薬を $12.5\mu\text{l}$ 、各プライマーは 7.5pmol 使用した。ここで 1 本鎖 cDNA は (1) で調製したものを G3PDH に関しては 30 倍希釈、FLJ13111 に関しては 10 倍希釈して使用した。なお検量線作成には、1 本鎖 cDNA に代えて $0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のマウスゲノム DNA (クロンテック社) を適当に希釈したものを $5\mu\text{l}$ 用いた。PCR は、 50°C で 10 分にかけて 95°C で 10 分の後、 95°C で 15 秒、 60°C で 60 秒の 2 ステップからなる工程を 45 サイクル繰り返すことにより行った。

各試料におけるマウス FLJ13111 遺伝子の発現量は、下記式に基づいて G3PDH 遺伝子の発現量で補正した。

$$[\text{FLJ13111 補正発現量}] = [\text{FLJ13111 遺伝子の発現量 (生データ)}] / [\text{G3PDH 遺伝子の発現量 (生データ)}]$$

発現量の比較においては C57BL/6J マウスの発現量を 100 とした相対量を図 8 に示した。図 8 に示す通り、FLJ13111 遺伝子の発現は、糖尿病モデルマウスの筋肉において発現が顕著に減少していることが判明した。従って FLJ13111 の筋肉における発現量減少はインスリン抵抗性を惹起すると考えられる。以上のことからインスリン抵抗性に FLJ13111 の関与が大きいと結論づけられる。

また本実施例の結果より、FLJ13111 発現量の測定により糖尿病病態の診断が出来ることが明らかとなった。

(実施例14) FLJ13111のプロモーター配列の同定、および該配列の転写誘導活性を利用した主作用を選択的に亢進する化合物のスクリーニング系

前述実施例11の知見から、FLJ13111の存在量の増加は主作用惹起効果の高い PPAR γ リガンドの作用を増強することが明らかである。この事実からFLJ13111遺伝子からのFLJ13111発現量を正に調節することにより、インスリン抵抗性を改善できる可能性が予測される。しかしFLJ13111遺伝子の発現調節に関わるプロモーター配列は明らかではなかった。そこでFLJ13111プロモーター配列の取得を試みた。まず、配列番号24および25に示す一対のプライマーを設計した。これらのプライマーを用いて実施例11(1)に記載のPCRと同じ反応条件でFLJ13111のプロモーター配列の増幅を試みたところ、約1.8kbpのcDNA断片の増幅に成功した。上述の実施例と同様の方法により該断片の塩基配列を決定したところ、3' 末端側に FLJ13111遺伝子のコード配列の一部を含む、配列番号26に示すポリヌクレオチドであることがわかった。該ポリヌクレオチド配列がFLJ13111の発現を制御するプロモーター活性を有するか否か、次の方法で検討した。ルシフェラーゼレポーターベクターであるpGL3-Basic Vector(プロメガ社)のマルチクローニングサイトに該ヌクレオチドを制限酵素BglIIIおよび Hind IIIを用いて挿入し、pGL3-FLJ13111pと名付けたレポータープラスミドを作製した。該プラスミドをCOS-1細胞にトランスフェクトし、前記ポリヌクレオチドを含まないpGL3-Basic Vector(空ベクター)をトランスフェクトした場合と比較することにより、該ポリヌクレオチドのプロモーターとしての発現誘導活性をルシフェラーゼの活性を指標に測定した。細胞へのトランスフェクション効率の補正及びルシフェラーゼアッセ

イの詳細は前述実施例5(3)に記載の方法と同じものを用いた。その結果、図9に示すように前記ポリヌクレオチドの存在に依存した有意なプロモーター活性が確認された。さらにこのプロモーター活性はトランスフェクトした細胞にPPAR γ のリガンドであるピオグリタゾン(0.1 μ M)を加えた場合に亢進されることが明らかになった。また本実験において前述のFLJ13111発現プラスミドであるpcDNA-FLJ13111をコトランスフェクトすると図9に示す通り前記ポリヌクレオチドのプロモーター活性は低下した。これらの事実から、クローニングしたポリヌクレオチドにはFLJ13111の発現を制御するプロモーター配列が含まれており、このプロモーターはインスリン抵抗性を低減させるピオグリタゾンなどのPPAR γ リガンドによって正に制御され、FLJ13111自身の存在によって負に制御されていることを示している。これにより、FLJ13111はリガンドを介してPPAR γ の活性を亢進させるのみでなく、インスリン抵抗性を低減させる効果が知られるPPAR γ のリガンドによってFLJ13111自身の発現量が亢進することにより、相乗的にインスリン抵抗性の低減に作用していることが予想された。

以上の知見から、本実施例におけるFLJ1311のプロモーターアッセイは、PPAR γ 蛋白質を利用せずにPPAR γ リガンドあるいはインスリン抵抗性改善薬をスクリーニングするために利用できる。

(実施例 15) ECHLP 過剰発現細胞における脂肪細胞分化能の測定

上述の通り、ECHLP 蛋白質は PPAR γ のリガンドの存在に依存して PPAR γ に結合し、PPAR γ の転写誘導活性を抑制することことが判明した。さらに ECHLP は糖尿病態において発現量が増加していることから、その過剰発現が PPAR γ の活性抑制を介してインスリン抵抗性を惹起し、2 型糖尿病の原因となっていることが予想された。一方、PPAR γ はリガンドに依存した転写活性の誘導により脂肪細胞の分化を促進し、その結果分化した脂肪細胞が血糖を取り込むことにより糖代謝が改善され、インスリン抵抗性が低減されることが知られている。そこで、実際に ECHLP の細胞中での過剰発現がインスリン抵抗性にリンクする脂肪細胞の分化に影響を与えるか否かを以下の実験により調査した。

(1) ECHLP 過剰発現 L1 細胞の樹立

C末端にDYKDDDDKからなるFLAG配列を付加したECHLPをレトロウイルスベクターpCLNCX（イムジェネックス社）に組み換えるため、pcDNA-ECHLPプラスミドより制限酵素を用いて約1-kbのBamHI-NotI断片を調製した。また、NotI部位-FLAG配列-XbaI部位からなるDNA断片を調製するため、配列番号27と配列番号28に示す2本の合成オリゴDNAを混合し加熱、徐冷して2本鎖DNA断片とした。これらのDNA断片を、pCLNCXのBamHIおよびXbaI部位で組み換え、pCLNCX-ECHLP-FLAGベクターを得た。このpCLNCX-ECHLP-FLAGベクターとpCL-Ecoベクター（イムジェネックス社）を共に、293細胞にリン酸カルシウム法により遺伝子導入した。遺伝子導入後24および48時間に、培養上清中の組み換えウイルスを回収した。未使用の細胞培養液（最少必須培地DMEM（ギブコ社））により2倍希釈し、更に最終濃度8 μ g/mlとなるようにポリブレン（シグマ社）を添加してマウス培養前駆脂肪細胞3T3-L1（ATCC）細胞に感染させた。感染後48時間より、1.5mg/mlG418（ナカライ）によりウイルス感染細胞を選別し、ECHLP-FLAG安定発現L1細胞を樹立した。コントロールとして、pCLNCXベクター（空ベクター）を感染させた細胞も同様に作製した。樹立細胞におけるECHLP-FLAGの発現は、抗FLAG M2抗体（シグマ社）を用いたウェスタンブロット法により確認した。具体的には、上述のECHLP-FLAG発現細胞の溶解液10 μ lに10 μ lの2倍濃度SDSサンプルバッファー（125mM トリス塩酸（pH6.8）、3%ラウレル硫酸ナトリウム、20%グリセリン、0.14M β -メルカプトエタノール、0.02%ブロムフェノールブルー）を添加し、100°Cで2分間処理した後、10%のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、試料中に含まれている蛋白質を分離した。セミドライ式ブロッティング装置（バイオラッド社）を用いてポリアクリルアミド中の蛋白質をニトロセルロース膜に転写した後、常法に従いウェスタンブロッティング法により該ニトロセルロース上のECHLP蛋白質の検出を行った。一次抗体にはECHLPのC末端に融合させたFLAGエピトープを認識するモノクローナル抗体（インビトロジェン社）を用い、二次抗体にはラビットIgG-HRP融合抗体（バイオラッド社）を用いた。その結果ECHLP-FLAG融合蛋白質を示す蛋白質がECHLP-FLAG発現ベクターの細胞導入に依存して検出されることを確認した。

（2）ピオグリタゾンによる脂肪細胞分化

上記の方法により樹立した空ベクター感染L1細胞又はECHLP感染L1細胞を、

96 穴プレートに 10^4 cell/well で培養し、48 時間後よりインスリン($1 \mu\text{g/ml}$)およびピオグリタゾン($0.1\text{--}3 \mu\text{M}$)を用いて脂肪細胞へ分化誘導した。脂肪細胞への分化の程度は細胞中に取り込まれたトリグリセリド量を指標とし、分化誘導開始後 7 日目の細胞を、トリグリセリド含量の測定に供与した。

(3) 細胞内トリグリセリド量の測定

2 穴の細胞を $40 \mu\text{l}$ の 0.1% SDS 溶液中に溶解し、 1ml のトリグリセリド測定試薬(トリグリセリド G-テストワコー、和光純薬工業)を加え、 37°C にて 10 分間加熱した。反応液の波長 505nm の吸光度 (OD_{505}) を測定した。その結果、図 10 に示すとおりコントロール細胞 (空ベクター感染 L1 細胞) ではピオグリタゾン ($0.1\text{--}3 \mu\text{M}$)により用量依存的に細胞内トリグリセリドが増加し、脂肪細胞への分化が認められた。一方 ECHLP 過剰発現細胞 (ECHLP 感染 L1 細胞)においては、ピオグリタゾン ($0.1\text{--}3 \mu\text{M}$)により誘導されたトリグリセリド増加は、いずれのピオグリタゾン用量においてもコントロール細胞における増加量の $43\text{--}57\%$ に抑制された。

脂肪細胞の分化抑制は脂肪細胞によって引き起こされる糖取込の総量を減少させる。したがって上記の結果から ECHLP の過剰発現は脂肪細胞分化を抑制することにより 2 型糖尿病の原因因子として作用していることが明らかになった。

(実施例 16) FLJ13111 と PPAR γ の結合を選択的に誘導するリガンドの同定

上述実施例 12 に示したものと同一のレポーターアッセイによるスクリーニングを行った結果、PPAR γ の転写誘導活性を促進する化合物 XF が得られた (図 11)。その力価は $10 \mu\text{M}$ でピオグリタゾンの $0.1 \mu\text{M}$ にほぼ匹敵することがわかった。さらにこの化合物 XF による PPAR γ の転写活性化能の促進作用はピオグリタゾンの場合と同様に FLJ13111 の過剰発現 ($0.1 \mu\text{g/ウェル}$) によって亢進することがわかった。

また、前述の実施例 2 に示したリガンド依存的な PPAR γ と FLJ13111 の結合を酵母ツーハイブリッド法により検出する系において、同一の条件下で GW7282 を化合物 XF に置き換える形で実験したところ、化合物 XF は前述の SRC-1、ECHLP, AOP2 などの蛋白質と PPAR γ の結合は誘導せずに、FLJ13111 と PPAR γ の結

合のみを誘導することを見出した。

(実施例 17) FLJ13111 選択的 PPAR γ リガンドによるナトリウム-カリウム ATP 分解酵素発現量の測定

PPAR γ リガンドによる浮腫は循環血漿量の増大によって引き起こされるが、これは腎細胞におけるナトリウム-カリウムATP分解酵素の発現量上昇とリンクして起こることが知られている。そこで、化合物XFが浮腫の惹起にリンクする腎細胞のナトリウム-カリウムATP分解酵素の発現量に影響を与えるか否か調査した。

具体的にはイヌ腎上皮細胞 MDCK は、10%牛胎児血清（シグマ社）を添加した最少必須培地 DMEM（ギブコ社）を用いて 24 穴培養プレートに 1.5×10^5 細胞/穴で 37°C にて 48 時間培養した。培養液に溶媒（ジメチルスルホキシド）のみ、あるいはピオグリタゾン（終濃度 0.1–10 μ M）または被験化合物 XF（終濃度 0.1–10 μ M）を添加し、さらに 6 時間培養した。1ml の測定用緩衝液（3mM MgSO₄, 3mM Na₂HPO₄, 10mM トリス塩酸, 250mM ショ糖）で細胞を 2 回洗浄した後、³H-ウアバイン（74Bq/ μ l、アマシャムバイオサイエンス社）および 2 μ M ウアバインを含む測定用緩衝液 200 μ l を加えて 37°C で 2 時間静置した。この条件で得られる結合放射活性を全結合量とした。また、非特異的結合量の測定には ³H-ウアバイン（74Bq/ μ l）および 1mM ウアバインを用いた。反応液を吸引除去後、1ml の氷冷測定用緩衝液で 3 回細胞を洗浄し、0.5N NaOH 水溶液（250 μ l）により細胞を溶解した。等量の 0.5N HCl 水溶液により中和後、5ml 液体シンチレータを加え、液体シンチレーション測定器により放射活性を計測した。³H-ウアバインの特異的結合量は、全結合量から非特異的結合量を差し引いた値として求め、ナトリウム-カリウム ATP 分解酵素の発現量を測定した。

その結果図 12 に示すとおり、ピオグリタゾンは溶媒のみを添加したコントロール細胞に比較して 0.1 μ M の添加で有意なナトリウム-カリウム ATP 分解酵素の発現量増大作用が見られた。それに対して化合物 XF は、上述の知見から PPAR γ 転写活性化においてはピオグリタゾンとほぼ同様の効果を示す 10 μ M の濃度を添加してもナトリウム-カリウム ATP 分解酵素の発現量を増大させなかった。すなわち、FLJ13111 選択的 PPAR γ リガンドである化合物 XF は浮腫を惹起するナトリウ

μ-カリウム ATP 分解酵素の酵素発現量の増大を引き起こさないことが明らかとなり、化合物 XF が浮腫の惹起に関与しないことが示された。

(実施例 18) FLJ13111 選択的 PPAR γ リガンドによる脂肪細胞分化能の測定

次に化合物 XF の添加がインスリン抵抗性の低減にリンクする脂肪細胞の分化に影響を与えるか否かを前述の実施例 15 と同様の方法により調査した。具体的にはマウス培養前駆脂肪細胞 3T3-L1 (ATCC) 細胞に、化合物 XF (1.0–10.0 μ M) を添加して 7 日目の細胞のトリグリセリド量を指標として脂肪細胞への分化の度合いを測定した。その結果、化合物 XF の添加は溶媒のみを添加した細胞に比較して約 20% 程度のトリグリセリド量の増加が認められた。

脂肪細胞の分化促進は脂肪細胞が担う糖取込の総量を増加させ、インスリン抵抗性を改善する。したがって以上の結果から化合物 XF は浮腫の惹起を引き起こさずにインスリン抵抗性を改善する作用を持つことが示された。

以上の結果から、FLJ13111 を用いることにより、主作用を選択的にもたらし、副作用を引き起こさない化合物、すなわちインスリン抵抗性改善薬をスクリーニングできることは明らかである。

産業上の利用可能性

本発明の、リガンド存在下で行う酵母ツーハイブリッドスクリーニング方法により、副作用と乖離したインスリン抵抗性改善薬をスクリーニングするのに有用なツールとなるリガンド依存的に PPAR と相互作用する蛋白質をスクリーニングすることができる。前記方法により得られた、主作用リガンド依存性 PPAR 結合分子 ECHLP、主作用リガンド選択的 PPAR γ 作用因子 FLJ13111、および副作用リガンド依存性 PPAR 結合分子 AOP2 を用いることにより、主作用を選択的にもたらし、副作用を引き起こさない化合物を同定及びスクリーニングすることができる。該スクリーニング系により選択された物質は、インスリン抵抗性改善薬の候補物質として有用である。

配列表フリーテキスト

以下の配列表の数字見出し<223>には、「Artificial Sequence」の説明を記載する。具体的には、配列表の配列番号 9、10、11、13、24、25、27、28 の配列で表される各塩基配列は、人工的に合成したプライマー配列である。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

請 求 の 範 囲

1. 糖代謝改善作用惹起効果の高いPPARリガンド存在下で、バイト(bait)として配列番号2で表されるPPAR γ 蛋白質の少なくとも第204番目から505番目を含む領域をコードするポリヌクレオチドを用い、プレイ(pre)としてcDNAライブラリーを用いる酵母ツーハイブリッドシステムを利用した、リガンド依存的にPPAR γ と相互作用する蛋白質をスクリーニングする方法。

2. 浮腫惹起効果の高いPPARリガンド存在下で、バイト(bait)として配列番号2で表されるPPAR γ 蛋白質の少なくとも第204番目から505番目を含む領域をコードするポリヌクレオチドを用い、プレイ(pre)としてcDNAライブラリーを用いる酵母ツーハイブリッドシステムを利用した、リガンド依存的にPPAR γ と相互作用する蛋白質をスクリーニングする方法。

3. i)配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1~10個のアミノ酸が欠失、置換、及び/または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARと相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ii)配列番号2または配列番号6で表されるPPAR蛋白質の少なくともリガンド結合領域と転写因子のDNA結合領域とからなる融合蛋白質をコードする遺伝子、及び、iii)前記転写因子のDNA結合領域が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞、

あるいは、

i)配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1~10個のアミノ酸が欠失、置換、及び/または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARと相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及びii)配列番号2または配列番号6で表されるPPAR蛋白質が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換され、a)配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1~10個のアミノ酸が欠失、置換、及び/または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存

的にPPARと相互作用するポリペプチド、及び、b) 配列番号2または配列番号6で表されるPPAR蛋白質を発現している細胞。

4. i) 配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号8で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARと相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ii) 配列番号2または配列番号6で表されるPPAR蛋白質の少なくともリガンド結合領域と転写因子のDNA結合領域からなる融合蛋白質をコードする遺伝子、及び、iii) 該転写因子のDNA結合領域が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞、

あるいは、

i) 配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号8で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARと相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及びii) 配列番号2または配列番号6で表されるPPAR蛋白質が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換され、a) 配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号8で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARと相互作用するポリペプチド、及び、b) 配列番号2または配列番号6で表されるPPAR蛋白質を発現している細胞。

5. 転写因子が酵母のGAL4蛋白質である請求の範囲3または4記載の細胞。

6. レポーター遺伝子がルシフェラーゼ遺伝子である請求の範囲3または4記載の細胞。

7. i) 請求項3に記載の細胞、PPARリガンド、及び被験物質を接触させる工程、及び、ii) レポーター遺伝子の発現を指標として該リガンド依存的な相互作用の変化または該リガンド依存的なPPARの転写活性誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、被験物質がPPARを介した糖代謝改善作用を促進するか否かを検出する方法。

8. i) 請求項3に記載の細胞、PPARリガンド、及び被験物質を接触させる工程、及び、ii) レポーター遺伝子の発現を指標として該リガンド依存的な相互作用の変化または該リガンド依存的なPPARの転写活性誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、インスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法。
9. インスリン抵抗性改善薬が糖代謝改善剤である請求の範囲8記載のスクリーニング方法
10. i) 請求の範囲4に記載の細胞に被験物質を接触させる工程、及び、ii) レポーター遺伝子の発現を指標として該被験物質による相互作用の変化または該被験物質によるPPARの転写活性誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、被験物質がPPARを介する浮腫惹起活性を促進するか否かを検出する方法。
11. i) 請求の範囲4に記載の細胞に被験物質を接触させる工程、ii) レポーター遺伝子の発現を指標として該被験物質による相互作用の変化または該被験物質によるPPARの転写活性誘導活性の変化を分析する工程、及びiii) レポーター活性を増大させない被験物質を選択する工程を含むことを特徴とする、浮腫惹起活性のないインスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法。
12. インスリン抵抗性改善薬が糖代謝改善剤である請求の範囲11記載のスクリーニング方法。
13. i) 配列番号17で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号17で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARと相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ii) 配列番号2または配列番号6で表されるPPAR蛋白質の少なくともリガンド結合領域と転写因子のDNA結合領域とからなる融合蛋白質をコードする遺伝子、及び、iii) 前記転写因子のDNA結合領域が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞、
あるいは、
i) 配列番号17で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号17で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARと相互作用

するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及びii)配列番号2または配列番号6で表されるPPAR蛋白質が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換され、a)配列番号17で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号17で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARと相互作用するポリペプチド、及び、b)配列番号2または配列番号6で表されるPPAR蛋白質を発現している細胞。

14. i)請求の範囲13に記載の細胞に被験物質を接触させる工程、及び、ii)レポーター遺伝子の発現を指標として該被験物質による相互作用の変化または該被験物質によるPPARの転写活性誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、被験物質がPPARを介した糖代謝改善作用を促進するか否かを検出する方法。

15. i)請求の範囲13に記載の細胞に被験物質を接触させる工程、及び、ii)レポーター遺伝子の発現を指標として該被験物質による相互作用の変化または該被験物質によるPPARの転写活性誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、インスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法。

16. インスリン抵抗性改善薬が糖代謝改善剤である請求の範囲15記載のスクリーニング方法。

17. i)配列番号26で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド、あるいは配列番号26で表される塩基配列において、1～10個の塩基が欠失、置換、及び／または挿入されたポリヌクレオチド配列を含みかつ転写プロモーター活性を有するポリヌクレオチド

に融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞に被験物質を接触させる工程、及び、ii)レポーター遺伝子の発現を指標として被験物質による転写活性誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、インスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法。

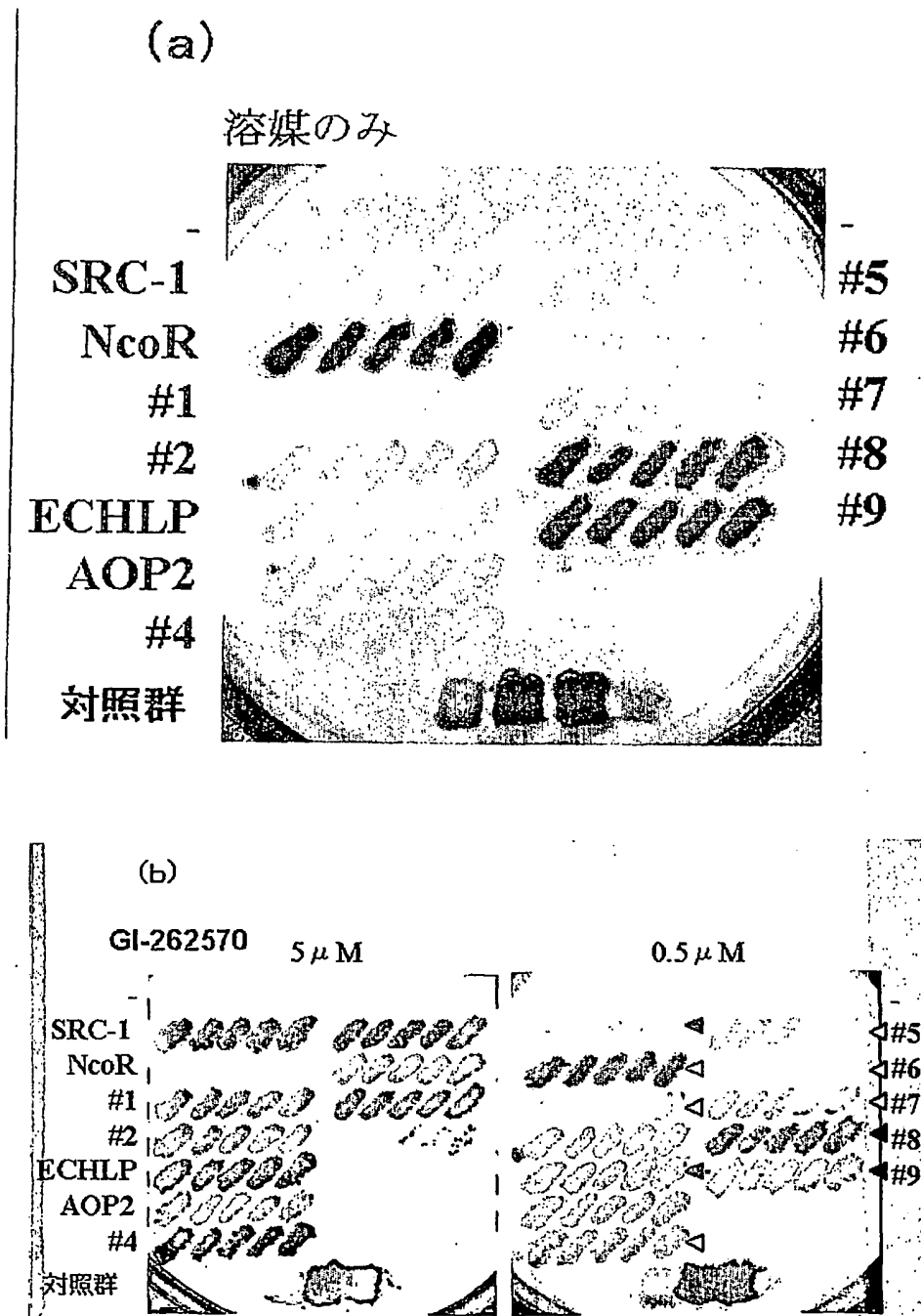
18. レポーター遺伝子がルシフェラーゼ遺伝子である請求の範囲17に記載の方法。

19. 請求の範囲8、11、15及び／又は17に記載のスクリーニング方法を用いてスクリーニングする工程、及び

前記スクリーニングにより得られた物質を用いて製剤化する工程

を含むことを特徴とする、インスリン抵抗性改善用医薬組成物の製造方法。

図1.



2/8

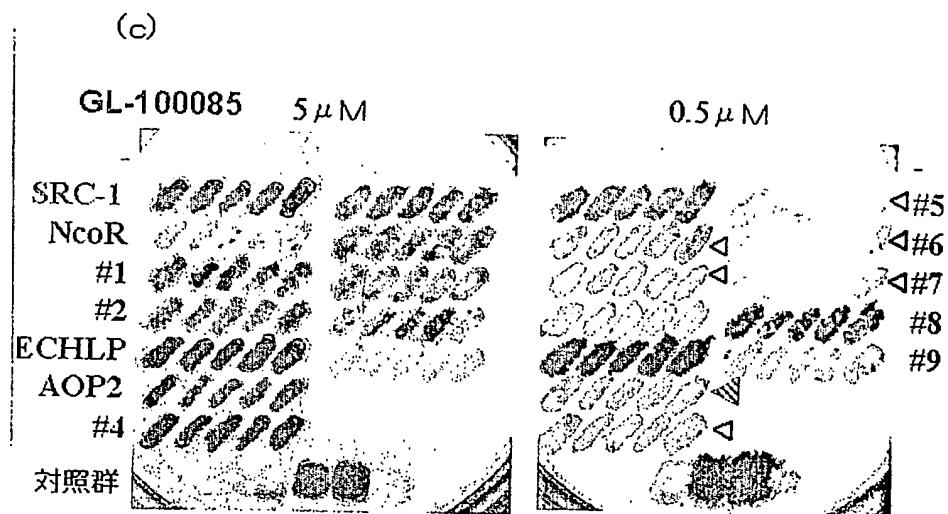


図 2.

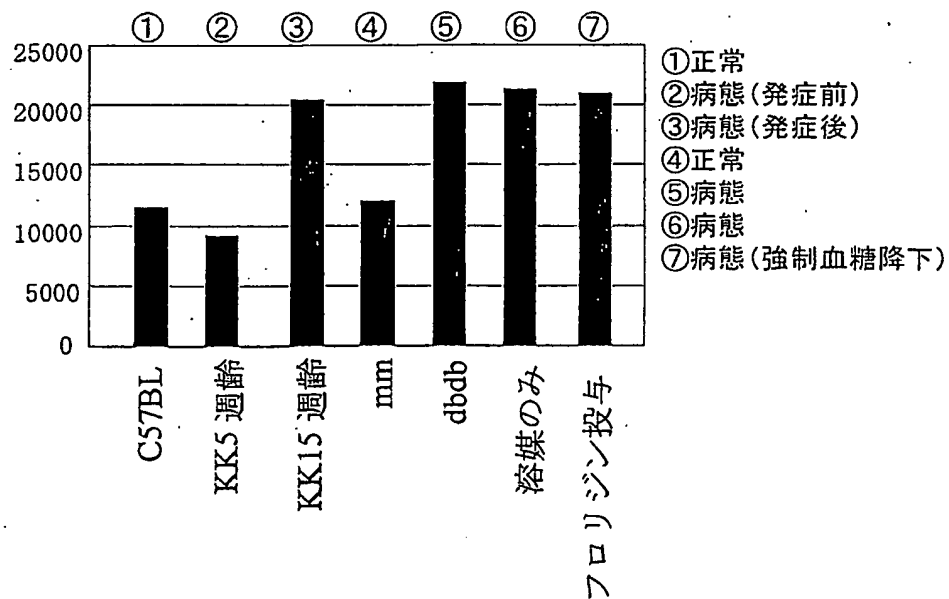


図 3.

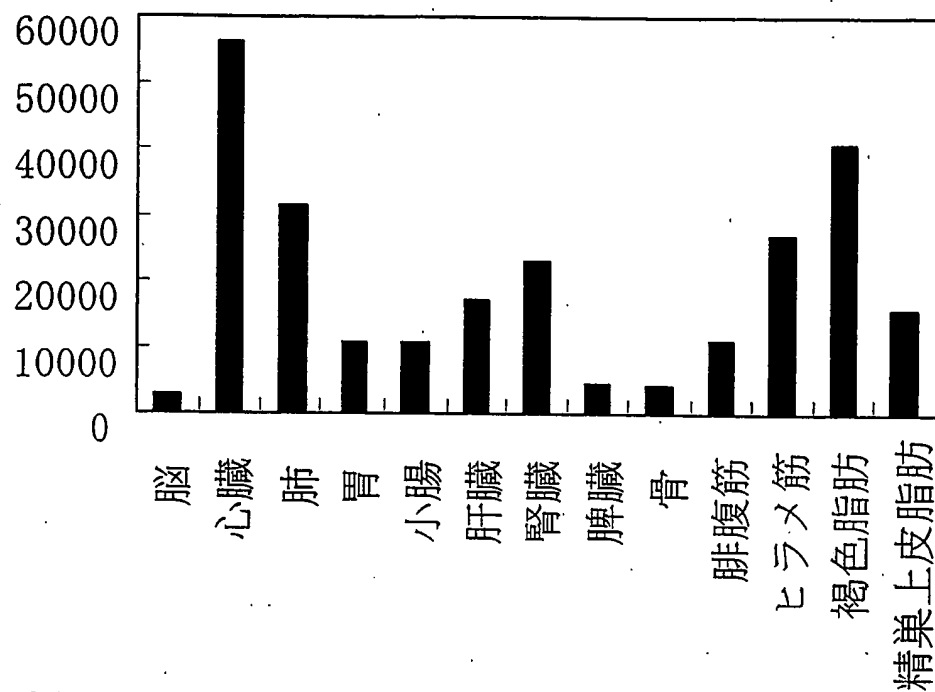
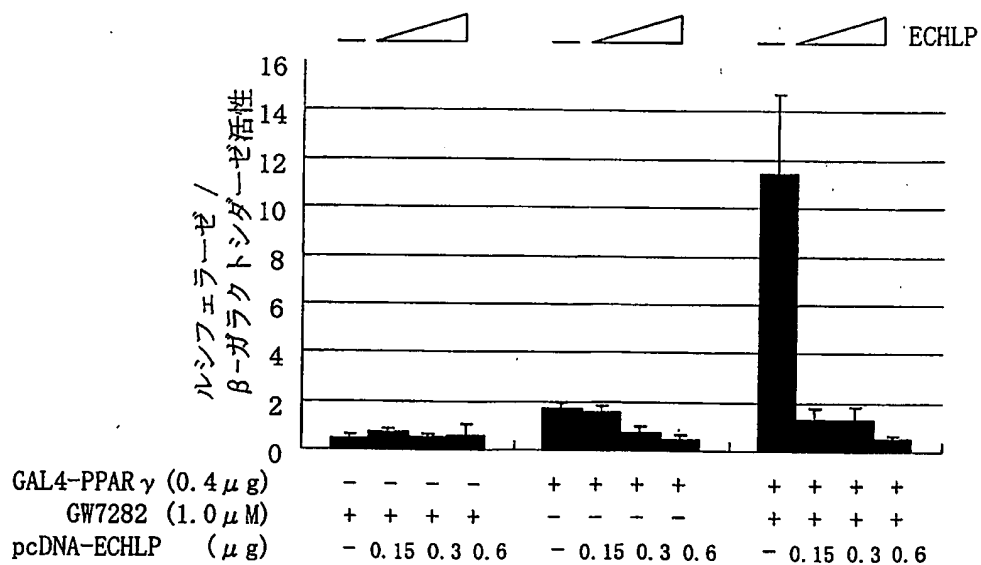
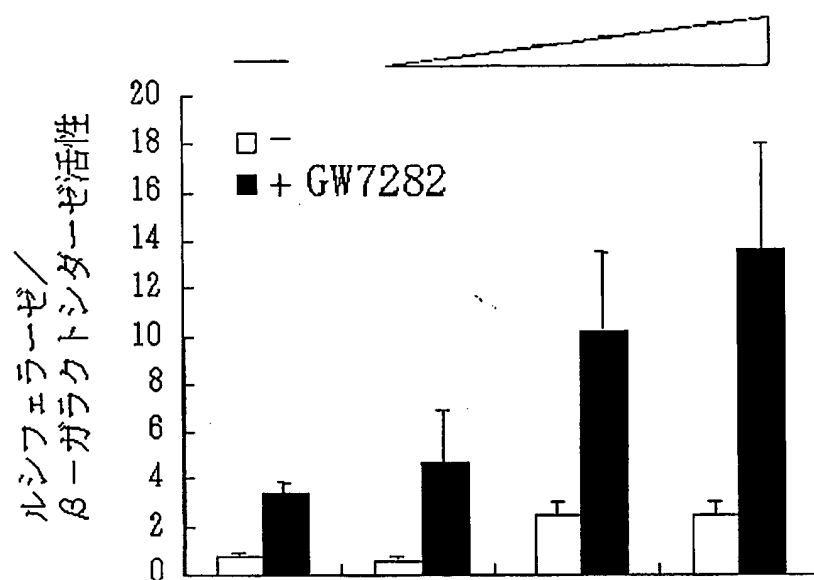


図 4.



4/8

図 5.

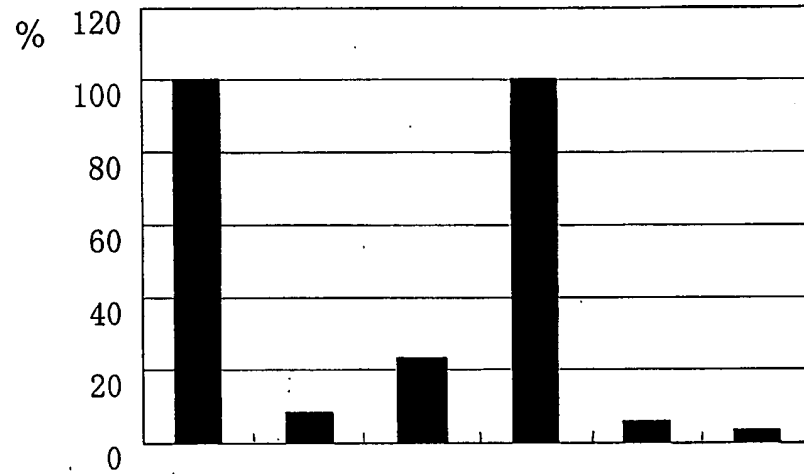


GAL4-PPAR γ	(0.4 μ g)	+	+	+	+
GW7282	(1.0 μ M)	+	+	+	+
pcDNA-AOP2	(μ g)	-	0.15	0.3	0.6

5/8

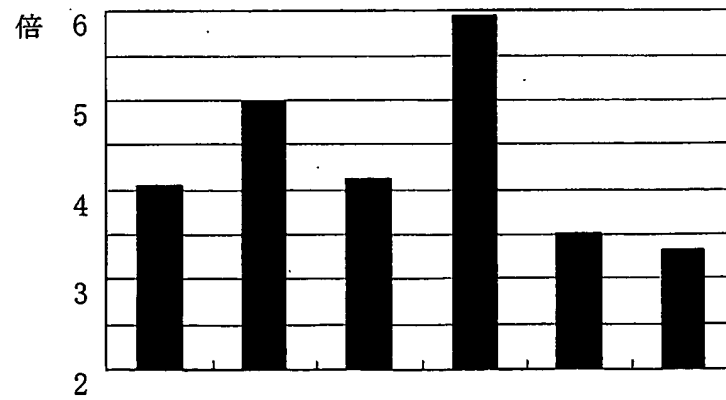
図 6.

(a)



GAL4-PPAR γ (0.4 μ g)	+	+	+	+	+	+
ECHLP (μ g)	-	0.6	0.6	-	0.6	0.6
GW7282 (0.1 μ M)	+	+	+	+	+	+
GI-262570 (μ M)	-	1.0	10	-	-	-
GL-100085 (μ M)	-	-	-	-	1.0	10

(b)



GAL4-PPAR γ (0.4 μ g)	+	+	+	+	+	+
AOP2 (μ g)	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
GW7282 (0.1 μ M)	1.0	10	-	-	-	-
GL-100085 (μ M)	-	-	1.0	10	-	-
GI-262570 (μ M)	-	-	-	-	1.0	10

6/8

図 7.

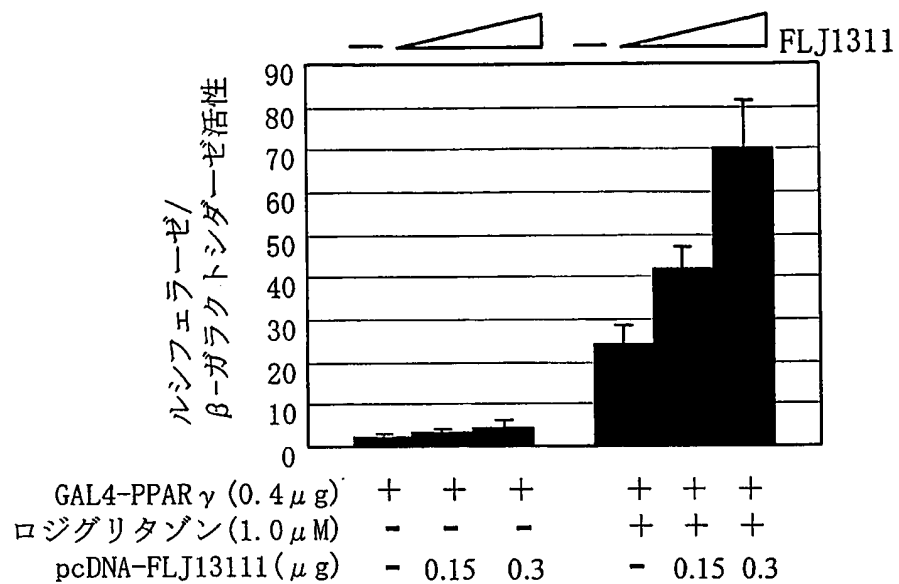
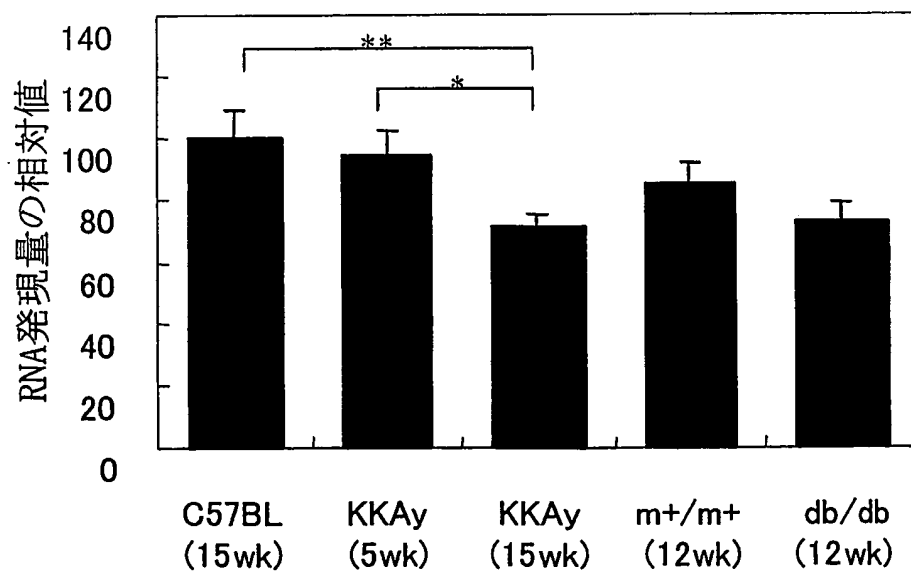


図 8.



7/8

図 9.

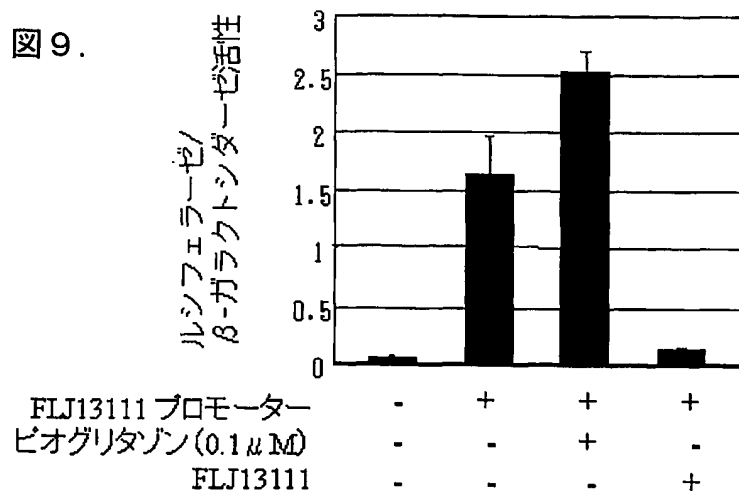


図 10.

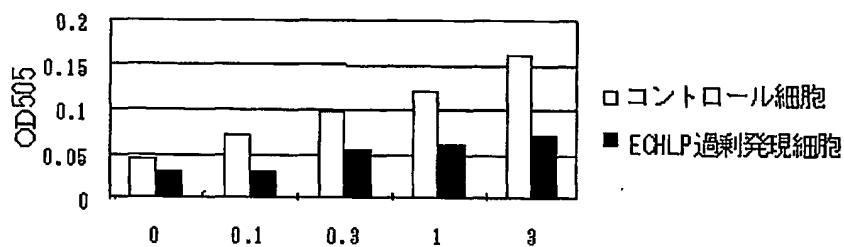


図 11.

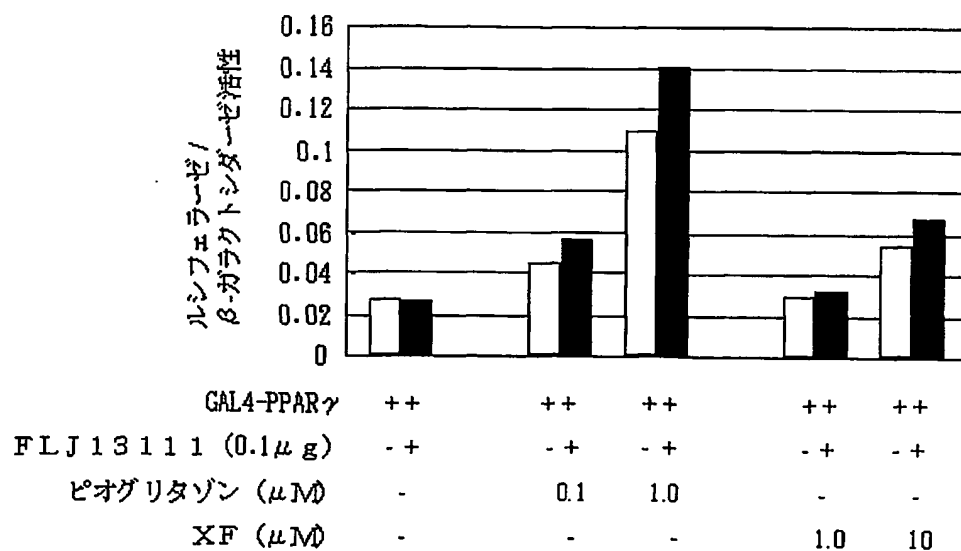
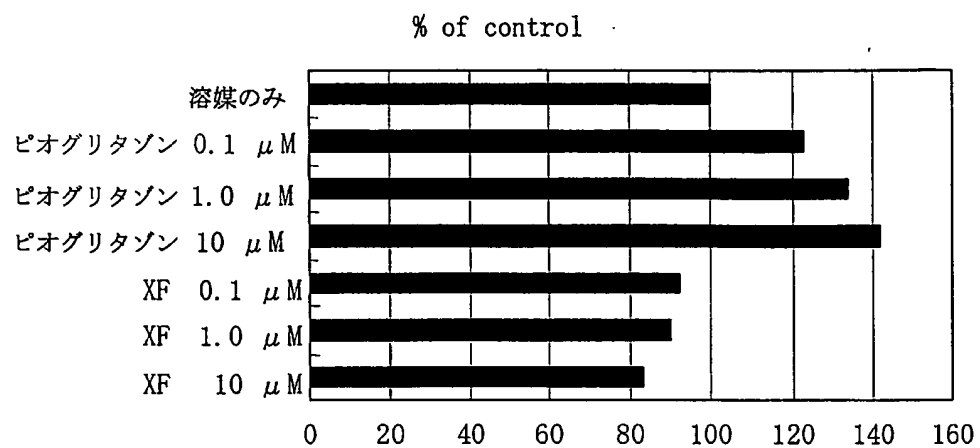


図 1 2 . .



SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> A screening method for detecting PPAR modulators

<130> Y0304-PCT

<150> JP2002-013721

<151> 2002-01-23

<150> JP2002-257703

<151> 2002-09-03

<160> 28

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1518

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1518)

<223> Inventor: Endoh, Hideki; Nakano, Ryosuke; Kurosaki, Eiji; Kato, Miyuki; Yokota, Hiroyuki; Inabe, Kazunori

<400> 1

atg ggt gaa act ctg gga gat tct cct att gac cca gaa agc gat tcc 48
Met Gly Glu Thr Leu Gly Asp Ser Pro Ile Asp Pro Glu Ser Asp Ser
1 5 10 15

ttc act gat aca ctg tct gca aac ata tca caa gaa atg acc atg gtt 96

2/37

Phe Thr Asp Thr Leu Ser Ala Asn Ile Ser Gln Glu Met Thr Met Val	
20 25 30	
gac aca gag atg cca ttc tgg ccc acc aac ttt ggg atc agc tcc gtg	144
Asp Thr Glu Met Pro Phe Trp Pro Thr Asn Phe Gly Ile Ser Ser Val	
35 40 45	
gat ctc tcc gta atg gaa gac cac tcc cac tcc ttt gat atc aag ccc	192
Asp Leu Ser Val Met Glu Asp His Ser His Ser Phe Asp Ile Lys Pro	
50 55 60	
ttc act act gtt gac ttc tcc agc att tct act cca cat tac gaa gac	240
Phe Thr Thr Val Asp Phe Ser Ser Ile Ser Thr Pro His Tyr Glu Asp	
65 70 75 80	
att cca ttc aca aga aca gat cca gtg gtt gca gat tac aag tat gac	288
Ile Pro Phe Thr Arg Thr Asp Pro Val Val Ala Asp Tyr Lys Tyr Asp	
85 90 95	
ctg aaa ott caa gag tac caa agt gca atc aaa gtg gag cct gca tct	336
Leu Lys Leu Gln Glu Tyr Gln Ser Ala Ile Lys Val Glu Pro Ala Ser	
100 105 110	
cca cct tat tat tct gag aag act cag ctc tac aat aag cct cat gaa	384
Pro Pro Tyr Tyr Ser Glu Lys Thr Gln Leu Tyr Asn Lys Pro His Glu	
115 120 125	
gag cct tcc aac tcc ctc atg gca att gaa tgt cgt gtc tgt gga gat	432
Glu Pro Ser Asn Ser Leu Met Ala Ile Glu Cys Arg Val Cys Gly Asp	
130 135 140	
aaa gct tct gga ttt cac tat gga gtt cat gct tgt gaa gga tgc aag	480
Lys Ala Ser Gly Phe His Tyr Gly Val His Ala Cys Glu Gly Cys Lys	
145 150 155 160	
ggt ttc ttc cgg aga aca atc aga ttg aag ctt atc tat gac aga tgt	528

3/37

Gly Phe Phe Arg Arg Thr Ile Arg Leu Lys Leu Ile Tyr Asp Arg Cys	
165 170 175	
gat ctt aac tgt cgg atc cac aaa aaa agt aga aat aaa tgt cag tac	576
Asp Leu Asn Cys Arg Ile His Lys Lys Ser Arg Asn Lys Cys Gln Tyr	
180 185 190	
tgt cgg ttt cag aaa tgc ctt gca gtg ggg atg tct cat aat gcc atc	624
Cys Arg Phe Gln Lys Cys Leu Ala Val Gly Met Ser His Asn Ala Ile	
195 200 205	
agg ttt ggg cgg atg cca cag gcc gag aag gag aag ctg ttg gcg gag	672
Arg Phe Gly Arg Met Pro Gln Ala Glu Lys Glu Lys Leu Leu Ala Glu	
210 215 220	
atc tcc agt gat atc gac cag ctg aat cca gag tcc gct gac ctc cgg	720
Ile Ser Ser Asp Ile Asp Gln Leu Asn Pro Glu Ser Ala Asp Leu Arg	
225 230 235 240	
gcc ctg gca aaa cat ttg tat gac tca tac ata aag tcc ttc ccg ctg	768
Ala Leu Ala Lys His Leu Tyr Asp Ser Tyr Ile Lys Ser Phe Pro Leu	
245 250 255	
acc aaa gca aag gcg agg gcg atc ttg aca gga aag aca aca gac aaa	816
Thr Lys Ala Lys Ala Arg Ala Ile Leu Thr Gly Lys Thr Thr Asp Lys	
260 265 270	
tca cca ttc gtt atc tat gac atg aat tcc tta atg atg gga gaa gat	864
Ser Pro Phe Val Ile Tyr Asp Met Asn Ser Leu Met Met Gly Glu Asp	
275 280 285	
aaa atc aag ttc aaa cac atc acc ccc ctg cag gag cag agc aaa gag	912
Lys Ile Lys Phe Lys His Ile Thr Pro Leu Gln Glu Gln Ser Lys Glu	
290 295 300	
gtg gcc atc cgc atc ttt cag ggc tgc cag ttt cgc tcc gtg gag gct	960

4/37

Val Ala Ile Arg Ile Phe Gln Gly Cys Gln Phe Arg Ser Val Glu Ala	
305	310 315 320
gtg cag gag atc aca gag tat gcc aaa agc att cct ggt ttt gta aat	1008
Val Gln Glu Ile Thr Glu Tyr Ala Lys Ser Ile Pro Gly Phe Val Asn	
325 330 335	
ctt gac ttg aac gac caa gta act ctc ctc aaa tat gga gtc cac gag	1056
Leu Asp Leu Asn Asp Gln Val Thr Leu Leu Lys Tyr Gly Val His Glu	
340 345 350	
atc att tac aca atg ctg gcc tcc ttg atg aat aaa gat ggg gtt ctc	1104
Ile Ile Tyr Thr Met Leu Ala Ser Leu Met Asn Lys Asp Gly Val Leu	
355 360 365	
ata tcc gag ggc caa ggc ttc atg aca agg gag ttt cta aag agc ctg	1152
Ile Ser Glu Gly Gln Gly Phe Met Thr Arg Glu Phe Leu Lys Ser Leu	
370 375 380	
cga aag cct ttt ggt gac ttt atg gag ccc aag ttt gag ttt gct gtg	1200
Arg Lys Pro Phe Gly Asp Phe Met Glu Pro Lys Phe Glu Phe Ala Val	
385 390 395 400	
aag ttc aat gca ctg gaa tta gat gac agc gac ttg gca ata ttt att	1248
Lys Phe Asn Ala Leu Glu Leu Asp Asp Ser Asp Leu Ala Ile Phe Ile	
405 410 415	
gct gtc att att ctc agt gga gac cgc cca ggt ttg ctg aat gtg aag	1296
Ala Val Ile Ile Leu Ser Gly Asp Arg Pro Gly Leu Leu Asn Val Lys	
420 425 430	
ccc att gaa gac att caa gac aac ctg cta caa gcc ctg gag ctc cag	1344
Pro Ile Glu Asp Ile Gln Asp Asn Leu Leu Gln Ala Leu Glu Leu Gln	
435 440 445	
ctg aag ctg aac cac cct gag tcc tca cag ctg ttt gcc aag ctg ctc	1392

5/37

Leu Lys Leu Asn His Pro Glu Ser Ser Gln Leu Phe Ala Lys Leu Leu
 450 455 460

cag aaa atg aca gac ctc aga cag att gtc acg gaa cac gtg cag cta 1440
 Gln Lys Met Thr Asp Leu Arg Gln Ile Val Thr Glu His Val Gln Leu
 465 470 475 480

ctg cag gtg atc aag aag acg gag aca gac atg agt ctt cac ccg ctc 1488
 Leu Gln Val Ile Lys Lys Thr Glu Thr Asp Met Ser Leu His Pro Leu
 485 490 495

ctg cag gag atc tac aag gac ttg tac tag 1518
 Leu Gln Glu Ile Tyr Lys Asp Leu Tyr
 500 505

<210> 2

<211> 505

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Glu Thr Leu Gly Asp Ser Pro Ile Asp Pro Glu Ser Asp Ser
 1 5 10 15

Phe Thr Asp Thr Leu Ser Ala Asn Ile Ser Gln Glu Met Thr Met Val
 20 25 30

Asp Thr Glu Met Pro Phe Trp Pro Thr Asn Phe Gly Ile Ser Ser Val
 35 40 45

Asp Leu Ser Val Met Glu Asp His Ser His Ser Phe Asp Ile Lys Pro

6/37

50

55

60

Phe Thr Thr Val Asp Phe Ser Ser Ile Ser Thr Pro His Tyr Glu Asp
 65 70 75 80

Ile Pro Phe Thr Arg Thr Asp Pro Val Val Ala Asp Tyr Lys Tyr Asp
 85 90 95

Leu Lys Leu Gln Glu Tyr Gln Ser Ala Ile Lys Val Glu Pro Ala Ser
 100 105 110

Pro Pro Tyr Tyr Ser Glu Lys Thr Gln Leu Tyr Asn Lys Pro His Glu
 115 120 125

Glu Pro Ser Asn Ser Leu Met Ala Ile Glu Cys Arg Val Cys Gly Asp
 130 135 140

Lys Ala Ser Gly Phe His Tyr Gly Val His Ala Cys Glu Gly Cys Lys
 145 150 155 160

Gly Phe Phe Arg Arg Thr Ile Arg Leu Lys Leu Ile Tyr Asp Arg Cys
 165 170 175

Asp Leu Asn Cys Arg Ile His Lys Lys Ser Arg Asn Lys Cys Gln Tyr
 180 185 190

Cys Arg Phe Gln Lys Cys Leu Ala Val Gly Met Ser His Asn Ala Ile

7/37

195

200

205

Arg Phe Gly Arg Met Pro Gln Ala Glu Lys Glu Lys Leu Leu Ala Glu
210 215 220

Ile Ser Ser Asp Ile Asp Gln Leu Asn Pro Glu Ser Ala Asp Leu Arg
225 230 235 240

Ala Leu Ala Lys His Leu Tyr Asp Ser Tyr Ile Lys Ser Phe Pro Leu
245 250 255

Thr Lys Ala Lys Ala Arg Ala Ile Leu Thr Gly Lys Thr Thr Asp Lys
260 265 270

Ser Pro Phe Val Ile Tyr Asp Met Asn Ser Leu Met Met Gly Glu Asp
275 280 285

Lys Ile Lys Phe Lys His Ile Thr Pro Leu Gln Glu Gln Ser Lys Glu
290 295 300

Val Ala Ile Arg Ile Phe Gln Gly Cys Gln Phe Arg Ser Val Glu Ala
305 310 315 320

Val Gln Glu Ile Thr Glu Tyr Ala Lys Ser Ile Pro Gly Phe Val Asn
325 330 335

Leu Asp Leu Asn Asp Gln Val Thr Leu Leu Lys Tyr Gly Val His Glu

8/37

340

345

350

Ile Ile Tyr Thr Met Leu Ala Ser Leu Met Asn Lys Asp Gly Val Leu
355 360 365

Ile Ser Glu Gly Gln Gly Phe Met Thr Arg Glu Phe Leu Lys Ser Leu
370 375 380

Arg Lys Pro Phe Gly Asp Phe Met Glu Pro Lys Phe Glu Phe Ala Val
385 390 395 400

Lys Phe Asn Ala Leu Glu Leu Asp Asp Ser Asp Leu Ala Ile Phe Ile
405 410 415

Ala Val Ile Ile Leu Ser Gly Asp Arg Pro Gly Leu Leu Asn Val Lys
420 425 430

Pro Ile Glu Asp Ile Gln Asp Asn Leu Leu Gln Ala Leu Glu Leu Gln
435 440 445

Leu Lys Leu Asn His Pro Glu Ser Ser Gln Leu Phe Ala Lys Leu Leu
450 455 460

Gln Lys Met Thr Asp Leu Arg Gln Ile Val Thr Glu His Val Gln Leu
465 470 475 480

Leu Gln Val Ile Lys Lys Thr Glu Thr Asp Met Ser Leu His Pro Leu

9/37

485

490

495

Leu Gln Glu Ile Tyr Lys Asp Leu Tyr
 500 505

<210> 3

<211> 987

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(987)

<223>

<400> 3

atg gcg gcg ggg ata gtg gct tct cgc aga ctc cgc gac cta ctg acc 48
 Met Ala Ala Gly Ile Val Ala Ser Arg Arg Leu Arg Asp Leu Leu Thr
 1 5 10 15

cgg cga ctg aca ggc tcc aac tac ccg gga ctc agt att agc ctt cgc 96
 Arg Arg Leu Thr Gly Ser Asn Tyr Pro Gly Leu Ser Ile Ser Leu Arg
 20 25 30

ctc act ggc tcc tct gca caa gag gcg gct tcc gga gta gcc ctc ggt 144
 Leu Thr Gly Ser Ser Ala Gln Glu Ala Ala Ser Gly Val Ala Leu Gly
 35 40 45

gaa gcc cca gac cac agc tat gag tcc ctt cgt gtg acg tct gcg cag 192
 Glu Ala Pro Asp His Ser Tyr Glu Ser Leu Arg Val Thr Ser Ala Gln
 50 55 60

aaa cat gtt ctg cat gtc cag ctc aac cgg ccc aac aag agg aat gcc 240
 Lys His Val Leu His Val Gln Leu Asn Arg Pro Asn Lys Arg Asn Ala

10/37

65	70	75	80	
atg aac aag gtc ttc tgg aga gag atg gta gag tgc ttc aac aag att				288
Met Asn Lys Val Phe Trp Arg Glu Met Val Glu Cys Phe Asn Lys Ile				
	85	90	95	
tcg aga gac gct gac tgt cgg gcg gtg gtg atc tct ggt gca gga aaa				336
Ser Arg Asp Ala Asp Cys Arg Ala Val Val Ile Ser Gly Ala Gly Lys				
	100	105	110	
atg ttc act gca ggt att gac ctg atg gac atg gct tcg gac atc ctg				384
Met Phe Thr Ala Gly Ile Asp Leu Met Asp Met Ala Ser Asp Ile Leu				
	115	120	125	
cag ccc aaa gga gat gat gtg gcc cgg atc agc tgg tac ctc cgt gac				432
Gln Pro Lys Gly Asp Asp Val Ala Arg Ile Ser Trp Tyr Leu Arg Asp				
	130	135	140	
atc atc act cga tac cag gag acc ttc aac gtc atc gag agg tgc ccc				480
Ile Ile Thr Arg Tyr Gln Glu Thr Phe Asn Val Ile Glu Arg Cys Pro				
145	150	155	160	
aag ccc gtg att gct gcc gtc cat ggg ggc tgc att ggc gga ggt gtg				528
Lys Pro Val Ile Ala Ala Val His Gly Gly Cys Ile Gly Gly Gly Val				
	165	170	175	
gac ctt gtc acc gcc tgt gac atc cgg tac tgt gcc cag gat gct ttc				576
Asp Leu Val Thr Ala Cys Asp Ile Arg Tyr Cys Ala Gln Asp Ala Phe				
	180	185	190	
ttc cag gtg aag gag gtg gac gtg ggt ttg gct gcc gat gta gga aca				624
Phe Gln Val Lys Glu Val Asp Val Gly Leu Ala Ala Asp Val Gly Thr				
	195	200	205	
ctg cag cgc ctg ccc aag gtc atc ggg aac cag agc ctg gtc aac gag				672
Leu Gln Arg Leu Pro Lys Val Ile Gly Asn Gln Ser Leu Val Asn Glu				

11/37

210	215	220	
ctg gcc ttc acc gcc cgc aag atg atg gct gac gag gcc ctg ggc agt			720
Leu Ala Phe Thr Ala Arg Lys Met Met Ala Asp Glu Ala Leu Gly Ser			
225	230	235	240
ggg ctg gtc agc cgg gtg ttc cca gac aaa gag gtc atg ctg gat gct			768
Gly Leu Val Ser Arg Val Phe Pro Asp Lys Glu Val Met Leu Asp Ala			
	245	250	255
gcc tta gcg ctg gcg gcc gag att tcc agc aag agc ccc gtg gcg gtg			816
Ala Leu Ala Leu Ala Ala Glu Ile Ser Ser Lys Ser Pro Val Ala Val			
	260	265	270
cag agc acc aag gtc aac ctg ctg tat tcc cgc gac cat tcg gtg gcc			864
Gln Ser Thr Lys Val Asn Leu Leu Tyr Ser Arg Asp His Ser Val Ala			
	275	280	285
gag agc ctc aac tac gtg gcg tcc tgg aac atg agc atg ctg cag acc			912
Glu Ser Leu Asn Tyr Val Ala Ser Trp Asn Met Ser Met Leu Gln Thr			
	290	295	300
caa gac ctc gtg aag tcg gtc cag gcc acg act gag aac aag gaa ctg			960
Gln Asp Leu Val Lys Ser Val Gln Ala Thr Thr Glu Asn Lys Glu Leu			
	305	310	315
aaa acc gtc acc ttc tcc aag ctc tga			987
Lys Thr Val Thr Phe Ser Lys Leu			
	325		

<210> 4

<211> 328

<212> PRT

<213> Homo sapiens

12/37

<400> 4

Met Ala Ala Gly Ile Val Ala Ser Arg Arg Leu Arg Asp Leu Leu Thr
1 5 10 15

Arg Arg Leu Thr Gly Ser Asn Tyr Pro Gly Leu Ser Ile Ser Leu Arg
20 25 30

Leu Thr Gly Ser Ser Ala Gln Glu Ala Ala Ser Gly Val Ala Leu Gly
35 40 45

Glu Ala Pro Asp His Ser Tyr Glu Ser Leu Arg Val Thr Ser Ala Gln
50 55 60

Lys His Val Leu His Val Gln Leu Asn Arg Pro Asn Lys Arg Asn Ala
65 70 75 80

Met Asn Lys Val Phe Trp Arg Glu Met Val Glu Cys Phe Asn Lys Ile
85 90 95

Ser Arg Asp Ala Asp Cys Arg Ala Val Val Ile Ser Gly Ala Gly Lys
100 105 110

Met Phe Thr Ala Gly Ile Asp Leu Met Asp Met Ala Ser Asp Ile Leu
115 120 125

Gln Pro Lys Gly Asp Asp Val Ala Arg Ile Ser Trp Tyr Leu Arg Asp
130 135 140

13/37

Ile Ile Thr Arg Tyr Gln Glu Thr Phe Asn Val Ile Glu Arg Cys Pro
145 150 155 160

Lys Pro Val Ile Ala Ala Val His Gly Gly Cys Ile Gly Gly Gly Val
165 170 175

Asp Leu Val Thr Ala Cys Asp Ile Arg Tyr Cys Ala Gln Asp Ala Phe
180 185 190

Phe Gln Val Lys Glu Val Asp Val Gly Leu Ala Ala Asp Val Gly Thr
195 200 205

Leu Gln Arg Leu Pro Lys Val Ile Gly Asn Gln Ser Leu Val Asn Glu
210 215 220

Leu Ala Phe Thr Ala Arg Lys Met Met Ala Asp Glu Ala Leu Gly Ser
225 230 235 240

Gly Leu Val Ser Arg Val Phe Pro Asp Lys Glu Val Met Leu Asp Ala
245 250 255

Ala Leu Ala Leu Ala Ala Glu Ile Ser Ser Lys Ser Pro Val Ala Val
260 265 270

Gln Ser Thr Lys Val Asn Leu Leu Tyr Ser Arg Asp His Ser Val Ala
275 280 285

14/37

Glu Ser Leu Asn Tyr Val Ala Ser Trp Asn Met Ser Met Leu Gln Thr
 290 295 300

Gln Asp Leu Val Lys Ser Val Gln Ala Thr Thr Glu Asn Lys Glu Leu
 305 310 315 320

Lys Thr Val Thr Phe Ser Lys Leu
 325

<210> 5
 <211> 1407
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1407)
 <223>

<400> 5
 atg gtg gac acg gaa agc cca ctc tgc ccc ctc tcc cca ctc gag gcc 48
 Met Val Asp Thr Glu Ser Pro Leu Cys Pro Leu Ser Pro Leu Glu Ala
 1 5 10 15
 ggc gat cta gag agc ccg tta tct gaa gag ttc ctg caa gaa atg gga 96
 Gly Asp Leu Glu Ser Pro Leu Ser Glu Glu Phe Leu Gln Glu Met Gly
 20 25 30
 aac atc caa gag att tcg caa tcc atc ggc gag gat agt tct gga agc 144
 Asn Ile Gln Glu Ile Ser Gln Ser Ile Gly Glu Asp Ser Ser Gly Ser
 35 40 45

15/37

ttt ggc ttt acg gaa tac cag tat tta gga agc tgt cct ggc tca gat	192
Phe Gly Phe Thr Glu Tyr Gln Tyr Leu Gly Ser Cys Pro Gly Ser Asp	
50 55 60	
ggc tcg gtc atc acg gac acg ctt tca cca gct tcg agc ccc tcc tcg	240
Gly Ser Val Ile Thr Asp Thr Leu Ser Pro Ala Ser Ser Pro Ser Ser	
65 70 75 80	
gtg act tat cct gtg gtc ccc ggc agc gtg gac gag tct ccc agt gga	288
Val Thr Tyr Pro Val Val Pro Gly Ser Val Asp Glu Ser Pro Ser Gly	
85 90 95	
gca ttg aac atc gaa tgt aga atc tgc ggg gac aag gcc tca ggc tat	336
Ala Leu Asn Ile Glu Cys Arg Ile Cys Gly Asp Lys Ala Ser Gly Tyr	
100 105 110	
cat tac gga gtc cac gcg tgt gaa ggc tgc aag ggc ttc ttt cgg cga	384
His Tyr Gly Val His Ala Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg	
115 120 125	
acg att cga ctc aag ctg gtg tat gac aag tgc gac cgc agc tgc aag	432
Thr Ile Arg Leu Lys Leu Val Tyr Asp Lys Cys Asp Arg Ser Cys Lys	
130 135 140	
atc cag aaa aag aac aga aac aaa tgc cag tat tgt cga ttt cac aag	480
Ile Gln Lys Lys Asn Arg Asn Lys Cys Gln Tyr Cys Arg Phe His Lys	
145 150 155 160	
tgc ctt tct gtc ggg atg tca cac aac gcg att cgt ttt gga cga atg	528
Cys Leu Ser Val Gly Met Ser His Asn Ala Ile Arg Phe Gly Arg Met	
165 170 175	
cca aga tot gag aaa gca aaa ctg aaa gca gaa att ctt acc tgt gaa	576
Pro Arg Ser Glu Lys Ala Lys Leu Lys Ala Glu Ile Leu Thr Cys Glu	
180 185 190	

16/37

cat gac ata gaa gat tct gaa act gca gat ctc aaa tct ctg gcc aag	624
His Asp Ile Glu Asp Ser Glu Thr Ala Asp Leu Lys Ser Leu Ala Lys	
195 200 205	
aga atc tac gag gcc tac ttg aag aac ttc aac atg aac aag gtc aaa	672
Arg Ile Tyr Glu Ala Tyr Leu Lys Asn Phe Asn Met Asn Lys Val Lys	
210 215 220	
gcc cgg gtc atc ctc tca gga aag gcc agt aac aat cca cct ttt gtc	720
Ala Arg Val Ile Leu Ser Gly Lys Ala Ser Asn Asn Pro Pro Phe Val	
225 230 235 240	
ata cat gat atg gag aca ctg tgt atg gct gag aag acg ctg gtg gcc	768
Ile His Asp Met Glu Thr Leu Cys Met Ala Glu Lys Thr Leu Val Ala	
245 250 255	
aag ctg gtg gcc aat ggc atc cag aac aag gag gcg gag gtc cgc atc	816
Lys Leu Val Ala Asn Gly Ile Gln Asn Lys Glu Ala Glu Val Arg Ile	
260 265 270	
ttt cac tgc tgc cag tgc acg tca gtg gag acc gtc acg gag ctc acg	864
Phe His Cys Cys Gln Cys Thr Ser Val Glu Thr Val Thr Glu Leu Thr	
275 280 285	
gaa ttc gcc aag gcc atc cca ggc ttc gca aac ttg gac ctg aac gat	912
Glu Phe Ala Lys Ala Ile Pro Gly Phe Ala Asn Leu Asp Leu Asn Asp	
290 295 300	
caa gtg aca ttg cta aaa tac gga gtt tat gag gcc ata ttc gcc atg	960
Gln Val Thr Leu Leu Lys Tyr Gly Val Tyr Glu Ala Ile Phe Ala Met	
305 310 315 320	
ctg tct tct gtg atg aac aaa gac ggg atg ctg gta gcg tat gga aat	1008
Leu Ser Ser Val Met Asn Lys Asp Gly Met Leu Val Ala Tyr Gly Asn	
325 330 335	

17/37

ggg ttt ata act cgt gaa ttc cta aaa agc cta agg aaa ccg ttc tgt Gly Phe Ile Thr Arg Glu Phe Leu Lys Ser Leu Arg Lys Pro Phe Cys 340 345 350	1056
gat atc atg gaa ccc aag ttt gat ttt gcc atg aag ttc aat gca ctg Asp Ile Met Glu Pro Lys Phe Asp Phe Ala Met Lys Phe Asn Ala Leu 355 360 365	1104
gaa ctg gat gac agt gat atc tcc ctt ttt gtg gct gct atc att tgc Glu Leu Asp Asp Ser Asp Ile Ser Leu Phe Val Ala Ala Ile Ile Cys 370 375 380	1152
tgt gga gat cgt cct ggc ctt cta aac gta gga cac att gaa aaa atg Cys Gly Asp Arg Pro Gly Leu Leu Asn Val Gly His Ile Glu Lys Met 385 390 395 400	1200
cag gag ggt att gta cat gtg ctc aga ctc cac ctg cag agc aac cac Gln Glu Gly Ile Val His Val Leu Arg Leu His Leu Gln Ser Asn His 405 410 415	1248
ccg gac gat atc ttt ctc ttc cca aaa ctt ctt caa aaa atg gca gac Pro Asp Asp Ile Phe Leu Phe Pro Lys Leu Leu Gln Lys Met Ala Asp 420 425 430	1296
ctc cgg cag ctg gtg acg gag cat gcg cag ctg gtg cag atc atc aag Leu Arg Gln Leu Val Thr Glu His Ala Gln Leu Val Gln Ile Ile Lys 435 440 445	1344
aag acg gag tcg gat gct gcg ctg cac ccg cta ctg cag gag atc tac Lys Thr Glu Ser Asp Ala Ala Leu His Pro Leu Leu Gln Glu Ile Tyr 450 455 460	1392
agg gac atg tac tga Arg Asp Met Tyr 465	1407

18/37

<210> 6

<211> 468

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Val Asp Thr Glu Ser Pro Leu Cys Pro Leu Ser Pro Leu Glu Ala
 1 5 10 15

Gly Asp Leu Glu Ser Pro Leu Ser Glu Glu Phe Leu Gln Glu Met Gly
 20 25 30

Asn Ile Gln Glu Ile Ser Gln Ser Ile Gly Glu Asp Ser Ser Gly Ser
 35 40 45

Phe Gly Phe Thr Glu Tyr Gln Tyr Leu Gly Ser Cys Pro Gly Ser Asp
 50 55 60

Gly Ser Val Ile Thr Asp Thr Leu Ser Pro Ala Ser Ser Pro Ser Ser
 65 70 75 80

Val Thr Tyr Pro Val Val Pro Gly Ser Val Asp Glu Ser Pro Ser Gly
 85 90 95

Ala Leu Asn Ile Glu Cys Arg Ile Cys Gly Asp Lys Ala Ser Gly Tyr
 100 105 110

19/37

His Tyr Gly Val His Ala Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg
115 120 125

Thr Ile Arg Leu Lys Leu Val Tyr Asp Lys Cys Asp Arg Ser Cys Lys
130 135 140

Ile Gln Lys Lys Asn Arg Asn Lys Cys Gln Tyr Cys Arg Phe His Lys
145 150 155 160

Cys Leu Ser Val Gly Met Ser His Asn Ala Ile Arg Phe Gly Arg Met
165 170 175

Pro Arg Ser Glu Lys Ala Lys Leu Lys Ala Glu Ile Leu Thr Cys Glu
180 185 190

His Asp Ile Glu Asp Ser Glu Thr Ala Asp Leu Lys Ser Leu Ala Lys
195 200 205

Arg Ile Tyr Glu Ala Tyr Leu Lys Asn Phe Asn Met Asn Lys Val Lys
210 215 220

Ala Arg Val Ile Leu Ser Gly Lys Ala Ser Asn Asn Pro Pro Phe Val
225 230 235 240

Ile His Asp Met Glu Thr Leu Cys Met Ala Glu Lys Thr Leu Val Ala
245 250 255

20/37

Lys Leu Val Ala Asn Gly Ile Gln Asn Lys Glu Ala Glu Val Arg Ile
260 265 270

Phe His Cys Cys Gln Cys Thr Ser Val Glu Thr Val Thr Glu Leu Thr
275 280 285

Glu Phe Ala Lys Ala Ile Pro Gly Phe Ala Asn Leu Asp Leu Asn Asp
290 295 300

Gln Val Thr Leu Leu Lys Tyr Gly Val Tyr Glu Ala Ile Phe Ala Met
305 310 315 320

Leu Ser Ser Val Met Asn Lys Asp Gly Met Leu Val Ala Tyr Gly Asn
325 330 335

Gly Phe Ile Thr Arg Glu Phe Leu Lys Ser Leu Arg Lys Pro Phe Cys
340 345 350

Asp Ile Met Glu Pro Lys Phe Asp Phe Ala Met Lys Phe Asn Ala Leu
355 360 365

Glu Leu Asp Asp Ser Asp Ile Ser Leu Phe Val Ala Ala Ile Ile Cys
370 375 380

Cys Gly Asp Arg Pro Gly Leu Leu Asn Val Gly His Ile Glu Lys Met
385 390 395 400

21/37

Gln Glu Gly Ile Val His Val Leu Arg Leu His Leu Gln Ser Asn His
 405 410 415

Pro Asp Asp Ile Phe Leu Phe Pro Lys Leu Leu Gln Lys Met Ala Asp
 420 425 430

Leu Arg Gln Leu Val Thr Glu His Ala Gln Leu Val Gln Ile Ile Lys
 435 440 445

Lys Thr Glu Ser Asp Ala Ala Leu His Pro Leu Leu Gln Glu Ile Tyr
 450 455 460

Arg Asp Met Tyr
 465

<210> 7
 <211> 675
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (675)
 <223>

<400> 7

atg ccc gga ggt ctg ctt ctc ggg gac gtg gct ccc aac ttt gag gcc
 Met Pro Gly Gly Leu Leu Leu Gly Asp Val Ala Pro Asn Phe Glu Ala
 1 5 10 15

48

22/37

aat acc acc gtc ggc cgc atc cgt ttc cac gac ttt ctg gga gac tca	96
Asn Thr Thr Val Gly Arg Ile Arg Phe His Asp Phe Leu Gly Asp Ser	
20 25 30	
tgg ggc att ctc ttc tcc cac cct cgg gac ttt acc cca gtg tgc acc	144
Trp Gly Ile Leu Phe Ser His Pro Arg Asp Phe Thr Pro Val Cys Thr	
35 40 45	
aca gag ctt ggc aga gct gca aag ctg gca cca gaa ttt gcc aag agg	192
Thr Glu Leu Gly Arg Ala Ala Lys Leu Ala Pro Glu Phe Ala Lys Arg	
50 55 60	
aat gtt aag ttg att gcc ctt tca ata gac agt gtt gag gac cat ctt	240
Asn Val Lys Leu Ile Ala Leu Ser Ile Asp Ser Val Glu Asp His Leu	
65 70 75 80	
gcc tgg agc aag gat atc aat gct tac aat tgt gaa gag ccc aca gaa	288
Ala Trp Ser Lys Asp Ile Asn Ala Tyr Asn Cys Glu Glu Pro Thr Glu	
85 90 95	
aag tta cct ttt ccc atc atc gat gat agg aat cgg gag ctt gcc atc	336
Lys Leu Pro Phe Pro Ile Ile Asp Asp Arg Asn Arg Glu Leu Ala Ile	
100 105 110	
ctg ttg ggc atg ctg gat cca gca gag aag gat gaa aag ggc atg cct	384
Leu Leu Gly Met Leu Asp Pro Ala Glu Lys Asp Glu Lys Gly Met Pro	
115 120 125	
gtg aca gct cgt gtg gtg ttt gtt ttt ggt cct gat aag aag ctg aag	432
Val Thr Ala Arg Val Val Phe Val Phe Gly Pro Asp Lys Lys Leu Lys	
130 135 140	
ctg tct atc ctc tac cca gct acc act ggc agg aac ttt gat gag att	480
Leu Ser Ile Leu Tyr Pro Ala Thr Thr Gly Arg Asn Phe Asp Glu Ile	
145 150 155 160	

23/37

ctc agg gta gtc atc tct ctc cag ctg aca gca gaa aaa agg gtt gcc 528
 Leu Arg Val Val Ile Ser Leu Gln Leu Thr Ala Glu Lys Arg Val Ala
 165 170 175

acc cca gtt gat tgg aag gat ggg gat agt gtg atg gtc ctt cca acc 576
 Thr Pro Val Asp Trp Lys Asp Gly Asp Ser Val Met Val Leu Pro Thr
 180 185 190

atc cct gaa gaa gaa gcc aaa aaa ctt ttc cgg aaa gga gtc ttc acc 624
 Ile Pro Glu Glu Glu Ala Lys Lys Leu Phe Pro Lys Gly Val Phe Thr
 195 200 205

aaa gag ctc cca tct ggc aag aaa tac ctc cgc tac aca ccc cag cct 672
 Lys Glu Leu Pro Ser Gly Lys Lys Tyr Leu Arg Tyr Thr Pro Gln Pro
 210 215 220

taa 675

<210> 8

<211> 224

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Pro Gly Gly Leu Leu Leu Gly Asp Val Ala Pro Asn Phe Glu Ala
 1 5 10 15

Asn Thr Thr Val Gly Arg Ile Arg Phe His Asp Phe Leu Gly Asp Ser
 20 25 30

Trp Gly Ile Leu Phe Ser His Pro Arg Asp Phe Thr Pro Val Cys Thr
 35 40 45

24/37

Thr Glu Leu Gly Arg Ala Ala Lys Leu Ala Pro Glu Phe Ala Lys Arg
50 55 60

Asn Val Lys Leu Ile Ala Leu Ser Ile Asp Ser Val Glu Asp His Leu
65 70 75 80

Ala Trp Ser Lys Asp Ile Asn Ala Tyr Asn Cys Glu Glu Pro Thr Glu
85 90 95

Lys Leu Pro Phe Pro Ile Ile Asp Asp Arg Asn Arg Glu Leu Ala Ile
100 105 110

Leu Leu Gly Met Leu Asp Pro Ala Glu Lys Asp Glu Lys Gly Met Pro
115 120 125

Val Thr Ala Arg Val Val Phe Val Phe Gly Pro Asp Lys Lys Leu Lys
130 135 140

Leu Ser Ile Leu Tyr Pro Ala Thr Thr Gly Arg Asn Phe Asp Glu Ile
145 150 155 160

Leu Arg Val Val Ile Ser Leu Gln Leu Thr Ala Glu Lys Arg Val Ala
165 170 175

Thr Pro Val Asp Trp Lys Asp Gly Asp Ser Val Met Val Leu Pro Thr
180 185 190

25/37

Ile Pro Glu Glu Glu Ala Lys Lys Leu Phe Pro Lys Gly Val Phe Thr
195 200 205

Lys Glu Leu Pro Ser Gly Lys Lys Tyr Leu Arg Tyr Thr Pro Gln Pro
210 215 220

<210> 9

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized
primer sequence

<400> 9

agagagtagt aacaaaggtc aaagacagtt gactgtatcg ggtacctotc ataatgcoat 60

cagg 64

<210> 10

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized
primer sequence

<400> 10

tggagacttg accaaacctc tggcgaagaa gtccaaagct cccgggctag tacaagtcct 60

26/37

tgtag

65

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> The sequence of the 5183th(5') to 5162th(3') bases in cloning vector pACT2 (GenBank U29899)

<400> 11

cgcggttgga atcactacag gg

22

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

atggcggcgg ggatagtg

18

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 13

27/37

gtagagcttg gagaaggtga cg

22

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

atgcccgag gtctgcttc

19

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

aggctggggt gtgtagcg

18

<210> 16

<211> 900

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (900)

<223>

<400> 16

atg gct gac cac aac cct gac agc gac tcc acg ccg cgc acg ctg ctg

48

Met Ala Asp His Asn Pro Asp Ser Asp Ser Thr Pro Arg Thr Leu Leu

1

5

10

15

28/37

cga cgc gtg ctg gat aca ggc gac ccg cgc acc ccg cgg cga ccc cgg	96
Arg Arg Val Leu Asp Thr Ala Asp Pro Arg Thr Pro Arg Arg Pro Arg	
20 25 30	
agt gct cgg gct gga gcc cgg aga gcc ctg ctt gaa acg gct tcc ccc	144
Ser Ala Arg Ala Gly Ala Arg Arg Ala Leu Leu Glu Thr Ala Ser Pro	
35 40 45	
agg aag ttg agt ggc caa aca agg acg ata gcc aga ggg cgt tcc cat	192
Arg Lys Leu Ser Gly Gln Thr Arg Thr Ile Ala Arg Gly Arg Ser His	
50 55 60	
gga gcc agg tct gtt ggc aga tcg gcc cat att cag gcc agt ggg cac	240
Gly Ala Arg Ser Val Gly Arg Ser Ala His Ile Gln Ala Ser Gly His	
65 70 75 80	
ttg gag gaa cag aca cct cgg acg ctg ctg aag aac atc cta cta act	288
Leu Glu Glu Gln Thr Pro Arg Thr Leu Leu Lys Asn Ile Leu Leu Thr	
85 90 95	
gcc cca gaa tct tcc atc ctg atg cct gag tcg gta gtg aag cca gtg	336
Ala Pro Glu Ser Ser Ile Leu Met Pro Glu Ser Val Val Lys Pro Val	
100 105 110	
cca gca ccg cag ggc gtc caa ccc tcc aga caa gag agc agt tgc ggc	384
Pro Ala Pro Gln Ala Val Gln Pro Ser Arg Gln Glu Ser Ser Cys Gly	
115 120 125	
agc ctg gag ctg caa ctt cct gag ctc gag ccc ccc aca acc ctg gct	432
Ser Leu Glu Leu Gln Leu Pro Glu Leu Glu Pro Pro Thr Thr Leu Ala	
130 135 140	
cca ggt ctg ctg gcc cct ggc agg agg aaa cag agg ctg aga ctg tca	480
Pro Gly Leu Leu Ala Pro Gly Arg Arg Lys Gln Arg Leu Arg Leu Ser	
145 150 155 160	

29/37

gtg ttt cag cag gga gtg gac cag ggg ctg tct ctc tcc caa gag cct	528
Val Phe Gln Gln Gly Val Asp Gln Gly Leu Ser Leu Ser Gln Glu Pro	
165 170 175	
caa ggg aat gct gat gcc tct tcc ctc acc aga tcc ctc aac ctg acc	576
Gln Gly Asn Ala Asp Ala Ser Ser Leu Thr Arg Ser Leu Asn Leu Thr	
180 185 190	
ttt gcc aca cct ctt cag cca cag tca gtg cag agg cct ggc ttg gcc	624
Phe Ala Thr Pro Leu Gln Pro Gln Ser Val Gln Arg Pro Gly Leu Ala	
195 200 205	
cgc aga cct cca gcc cgc cga gct gta gac gtg ggt gcc ttt ttg cgg	672
Arg Arg Pro Pro Ala Arg Arg Ala Val Asp Val Gly Ala Phe Leu Arg	
210 215 220	
gat ctg cga gat act tcc ctg gct cct cca aac att gtg ttg gag gac	720
Asp Leu Arg Asp Thr Ser Leu Ala Pro Pro Asn Ile Val Leu Glu Asp	
225 230 235 240	
acc cag ccg ttc tct cag ccc atg gtt ggc tcc ccc aac gtg tat cac	768
Thr Gln Pro Phe Ser Gln Pro Met Val Gly Ser Pro Asn Val Tyr His	
245 250 255	
tcc ctg ccc tgc acg cct cac act ggg gct gaa gac gct gag cag gct	816
Ser Leu Pro Cys Thr Pro His Thr Gly Ala Glu Asp Ala Glu Gln Ala	
260 265 270	
gcc ggt cgc aag aca cag agc agt ggg cct ggg ctg cag aag aat agt	864
Ala Gly Arg Lys Thr Gln Ser Ser Gly Pro Gly Leu Gln Lys Asn Ser	
275 280 285	
gag tgt gtg gca ctg gtg gcc tgg agc caa att tag	900
Glu Cys Val Ala Leu Val Ala Trp Ser Gln Ile	
290 295	

30/37

<210> 17
<211> 299
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Ala Asp His Asn Pro Asp Ser Asp Ser Thr Pro Arg Thr Leu Leu
1 5 10 15

Arg Arg Val Leu Asp Thr Ala Asp Pro Arg Thr Pro Arg Arg Pro Arg
20 25 30

Ser Ala Arg Ala Gly Ala Arg Arg Ala Leu Leu Glu Thr Ala Ser Pro
35 40 45

Arg Lys Leu Ser Gly Gln Thr Arg Thr Ile Ala Arg Gly Arg Ser His
50 55 60

Gly Ala Arg Ser Val Gly Arg Ser Ala His Ile Gln Ala Ser Gly His
65 70 75 80

Leu Glu Glu Gln Thr Pro Arg Thr Leu Leu Lys Asn Ile Leu Leu Thr
85 90 95

Ala Pro Glu Ser Ser Ile Leu Met Pro Glu Ser Val Val Lys Pro Val
100 105 110

31/37

Pro Ala Pro Gln Ala Val Gln Pro Ser Arg Gln Glu Ser Ser Cys Gly
115 120 125

Ser Leu Glu Leu Gln Leu Pro Glu Leu Glu Pro Pro Thr Thr Leu Ala
130 135 140

Pro Gly Leu Leu Ala Pro Gly Arg Arg Lys Gln Arg Leu Arg Leu Ser
145 150 155 160

Val Phe Gln Gln Gly Val Asp Gln Gly Leu Ser Leu Ser Gln Glu Pro
165 170 175

Gln Gly Asn Ala Asp Ala Ser Ser Leu Thr Arg Ser Leu Asn Leu Thr
180 185 190

Phe Ala Thr Pro Leu Gln Pro Gln Ser Val Gln Arg Pro Gly Leu Ala
195 200 205

Arg Arg Pro Pro Ala Arg Arg Ala Val Asp Val Gly Ala Phe Leu Arg
210 215 220

Asp Leu Arg Asp Thr Ser Leu Ala Pro Pro Asn Ile Val Leu Glu Asp
225 230 235 240

Thr Gln Pro Phe Ser Gln Pro Met Val Gly Ser Pro Asn Val Tyr His
245 250 255

32/37

Ser Leu Pro Cys Thr Pro His Thr Gly Ala Glu Asp Ala Glu Gln Ala
260 265 270

Ala Gly Arg Lys Thr Gln Ser Ser Gly Pro Gly Leu Gln Lys Asn Ser
275 280 285

Glu Cys Val Ala Leu Val Ala Trp Ser Gln Ile
290 295

<210> 18
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 18
atggctgacc acaacc

17

<210> 19
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 19
aatttggctc caggcc

16

<210> 20
<211> 24
<212> DNA
<213> Mus sp.

<400> 20

33/37

gccaaacaaa gacaagtgct agga

24

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 21

cgaccttgaa cacgagtcga t

21

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 22

aaagtggaga ttgttgccat

20

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 23

ttgactgtgc cgttgaatt

19

<210> 24

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

34/37

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized
primer sequence

<400> 24

ttagatctgt gtctagaaa gtaccc

26

<210> 25

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized
primer sequence

<400> 25

ttaagcttct acgaaggatc cggggatg

28

<210> 26

<211> 1870

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222> (1).. (1870)

<223>

<400> 26

atctgtgtcc tagaaagtac ccaagcagac aatctacagg gtctgaaat aactgcttct 60

agttctagat ttacctcat tgcctgtgg gtagtcctc cttattgcc agctccactg 120

gcaaagttgg cctctcctga gcctcttgga tgaacctgat ttccatgtcc tcatgggcca 180

35/37

ggatatggac taggaaagt acatccagag agaaggcagg gcttggtaaa atctgagcag 240
cattcttgcc tattcttcct gaccaggag aataactagg cagagcaatt catatgcaag 300
aaaacttcta ggtcaagagt acttggaaga agtgaccaga aatgaacaga aaaacattac 360
ctgggaaaat attcaaggag gaagaaaaaa atatgcaggg tcagtggctt tcttcacott 420
gggtctcaat cagcccttct aagagacctg atattctgct tgctcctgag gccagagctg 480
cagagattga gctgctgctg cttttttttt tttctttttc ttttttttg agacagagtc 540
ttgctctgtc gcccaggctg gagtgcagtg gcatgatctc tgcccactgc aacctctgcc 600
tcccggattc aagcgattct cctgcctcag cctcccaagt agctgggatt acagggtcac 660
gccaccacac ccagcttttt ttatttttga gacagagtct tgccctgtca cccaggctgg 720
agtacagtgg catgatctca gttcactgcg acctccacct ccggggttca agcaattctc 780
ctgcctcagt ctcttgagta gctaggatta cagaagtga cctocacgtt cagctaattt 840
ttgtattttt agtagagatg cgcttttgcc atgttgcca tgotagtctg gaaccccgga 900
cctcaggatga tccgctggcc ttggcctccc aaagtgctgg gattgcaggc gtgagccatc 960
gcgccaggcc tgagctactc ctttagtctc tggaaagact gcggctcaga gaaatcaacg 1020
ctttacatgc catctctccc ctagtcccaa ggtcttctct ggactggttc cttaattttac 1080
catctctcaa tcagaagcgc ctttacaag gatatcagga tagtattttt tggtaaaga 1140
taactcttcc ccagaaactc agtaggtct ctgatggcat cagtaagggc aatttcataa 1200
agcaaccagg ttctgcctg tttacaggca gctccagttg ttgggaagtg agcaagcaag 1260

36/37

tgaggggaag ccagactttc tggagcttcc agccctagtt ctgccaccca ggcttcggga 1320
 gggccccaca aagtctgaaa tctacgtgcc ccacccccca aagccccttc cagcccaggt 1380
 tctggttttag cactaggctc aagaacctca ggctgaatt ctacttcccg tgcattaagt 1440
 cccaccttaa catccattc ttatgaagtc atcctgtcct gcggggcaat tctgtgttgc 1500
 tgctggggcc tggtcactga tagagaaggc cgtgggctgg gcctaccogg caggagccgc 1560
 ctcaccccat caggcccaga tcctctaaga caagacaggc ataaagtctc ccgtggaatc 1620
 ccctcccgcc tcatattccc tgaccctgcc ctccctgcga gaactocagt ccgggctcca 1680
 caaagggcgc ggtaagaaac gtacattcc gaggggcaga caaggagggg gcgttcaoct 1740
 acaccccggc cgggctatgg tcgggaacag ggtgaggggc ccaagccccg gctgcggcag 1800
 gcgggcgccc ttacccatgc tgactctgga gcgggccggg tggcgctgcc catccccgga 1860
 tccttcgtag 1870

<210> 27

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized
 primer sequence

<400> 27

ggccgcgact acaaggacga tgacgataag tg

32

37/37

<210> 28

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized
primer sequence

<400> 28

ctagatcact tatcgatcatc gtccctttag tcgc

34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00546

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C12N15/62, C12N15/81, C07K14/705, C07K16/18,
C12N1/19, C12N1/21, A61P3/10, C12Q1/66

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, C12N15/62, C12N15/81, C07K14/705, C07K16/18,
C12N1/19, C12N1/21, A61P3/10, C12Q1/66

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), PubMed, BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG),
SwissProt/PIR/GeneSeq/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 193256 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 03 September, 1986 (03.09.86), & JP 61-267580 A & US 4687777 A	1-18
A	JP 2001-340080 A (Yoshitomo OKA), 11 December, 2001 (11.12.01), (Family: none)	1-18
A	WO 99/12534 A1 (Ono Pharmaceutical Co., Ltd.), 08 March, 1999 (08.03.99), & AU 9889966 A	1-18
A	TREUTER E. et al., A regulatory role for RIP140 in Nuclear receptor activation., Molecular Endocrinology, 1998, Vol.21, No.6, pages 864 to 881	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
10 April, 2003 (10.04.03)

Date of mailing of the international search report
30 April, 2003 (30.04.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00546

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1057896 A1 (Tanabe Seiyaku Co., Ltd.), 06 December, 2000 (06.12.00), & WO 99/10532 A1 & JP 11-56369 A & US 6365361 B1	1-18
A	EP 930299 A1 (Japan Tobacco Inc.), 21 July, 1999 (21.07.99), & JP 9-323982 A & WO 98/07699 A1 & US 6204277 B1	1-18
A	WO 97/31907 A1 (GLAXO GROUP LTD.), 04 September, 1997 (04.09.97), & EP 888317 A1 & JP 2000-507216 A & US 6294580 B1	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00546

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 19
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Concerning the "substance obtained by screening" as set forth in the above claim, it is completely unknown what specific compounds are involved and what are not, even referring to the statement in the description (p. 29, lines 2 to 9). Thus this claim is described in (continued to extra sheet)
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.


PCT/JP03/00546

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

an extremely unclear manner and, therefore, no meaningful international search can be made thereon.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO3/00546

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ¹ C12N15/12, C12N15/62, C12N15/81, C07K14/705, C07K16/18, C12N1/19, C12N1/21, A61P3/10, C12Q1/66		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ¹ C12N15/12, C12N15/62, C12N15/81, C07K14/705, C07K16/18, C12N1/19, C12N1/21, A61P3/10, C12Q1/66		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA (STN), PubMed, BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG) SwissProt/PIR/GeneSeq/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP 193256 A (武田薬品工業株式会社) 1986. 09. 03 & JP 61-267580 A & US 4687777 A	1-18
A	JP 2001-340080 A (岡芳知) 2001. 12. 11 (ファミリーなし)	1-18
A	WO 99/12534 A1 (小野薬品工業株式会社) 1999. 03. 08 & AU 9889966 A	1-18
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 10. 04. 03	国際調査報告の発送日 30.04.03	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 鈴木 恵理子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4B 3037 

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	TREUTER E. et al. A regulatory role for RIP140 in Nuclear receptor activation., Molecular Endocrinology 1998, Vol. 12, No. 6, p. 864-881	1-18
A	EP 1057896 A1 (田辺製薬株式会社) 2000. 12. 06 & WO 99/10532 A1 & JP 11-56369 A & US 6365361 B1	1-18
A	EP 930299 A1 (日本たばこ産業株式会社) 1999. 07. 21 & JP 9-323982 A & WO 98/07699 A1 & US 6204277 B1	1-18
A	WO 97/31907 A1 (GLAXO GROUP LTD) 1997. 09. 04 & EP 888317 A1 & JP 2000-507216 A & US 6294580 B1	1-18

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.